

**A 60 kDa-os hősokkfehérje elleni autoantitestek jellegzetességei
és szerepük az atherogenezisben**

Dr. Prohászka Zoltán

**Semmelweis Egyetem
III. Sz. Belgyógyászati Klinika
MTA-SE Anyagcsere és Atherosclerosis Kutatócsoport**

Akadémiai Doktori Értekezés

Budapest, 2005

Tartalomjegyzék

Összefoglalás

Bevezetés, az értekezés felépítése

1, Az atherosclerosis patogenezise

Bevezetés

Az atherosclerosis kialakulását magyarázó klasszikus elméletek

Az atherosclerosis mint gyulladásos betegség

Az atheroscleroticus érbetegségek klinikai megjelenése és lefolyása

Autoimmunitás, mint az atheroscleroticus folyamat kiváltója

A 60 kDa-os hősokkfehérje család jellemzői

A Hsp60 immunológiai sajátosságai

A Hsp60 elleni autoimmunitás és az atherosclerosis kapcsolata

Az anti-Hsp60 autoantitestek és az atherosclerosis kapcsolata – saját vizsgálatok

Az anti-M. bovis Hsp65 és anti-humán Hsp60 autoantitestek közötti különbségek elemzése

Az anti-Hsp60 antitestek epitóp specifitásának vizsgálata

A komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek jellemzése

Az anti-Hsp60 autoantitestek vizsgálata HIV-fertőzöttekben és szisztémás autoimmun kórképekben szenvedőkben

Megbeszélés és a további munkahipotézis kifejtése

A 60 kDa-os hősokkfehérjék elleni antitestek szerepe az atherosclerosis patogenezisében

Az anti-Hsp60 autoantitestek és az anti-M. bovis Hsp65 antitestek összehasonlító vizsgálata

További munkahipotézisünk ismertetése

2, Az anti-Hsp60 autoantitestek, mint természetes autoantitestek

A természetes autoantitestek jellegzetességei

Hsp60, mint a természetes autoantitestek célantigénje

Egér embrionális hibridómák polireaktív, Hsp60-at is felismerő IgM antitesteket termelnek

Emberi köldökzsinór vérben kimutathatók IgM anti-Hsp60 autoantitestek

Az anti-Hsp60 autoantitestek szintje éveken keresztül stabil egészséges felnőttekben

Megbeszélés és a további munkahipotézis ismertetése

Anti-Hsp60 autoantitestek, mint a természetes autoantitest repertoár részei

A további munkahipotézis kifejtése

3, Az anti-Hsp60 autoantitestek szintjét befolyásoló tényezők vizsgálata

Bevezetés

Fertőzőes tényezők és az anti-Hsp antitestszintek kapcsolata

Genetikai tényezők és az anti-Hsp antitestszintek kapcsolata

Episztatikus kölcsönhatások és autoantitest reguláció

Megbeszélés

A fertőzések szerepe az atherosclerosis etiopatogenezisében

Fertőzőes tényezők és az anti-Hsp antitestek kapcsolata

Genetikai tényezők és az autoantitestek termelésének szabályozása

Episztatikus kölcsönhatások, mint autoantitestszintekkel kapcsolatot mutató tényezők

A gén-gén kölcsönhatások alapvető jellegzetességei

A további munkahipotézis ismertetése

4, Az anti-Hsp60 autoantitestek és a koronária események kapcsolata

Az eseménymentes túlélés és az anti-Hsp60 autoantitestek kapcsolata koronária betegségben

Logikai adatfeldolgozás (LAD)

Hogyan lehet felismerni a változók közötti kölcsönhatásokat?

A kardiovaszkuláris események és klinikai paraméterek kapcsolatának elemzése logikai adatfeldolgozással

Megbeszélés

5, Az új megállapítások összefoglalása, következtetések

Az eredmények rövid összefoglalása

Következtetések

Irodalmi hivatkozások

Melléklet

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Prohászka Z, Duba J, Horváth L, Császár A, Karádi I, Szebeni A, Singh M, Fekete B, Romics L, Füst G. **2001**. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat-shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 31:285-292
- II. Prohászka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Jánoskúti L, Császár A, Karádi I, Nagy K, Singh M, Romics L, and Füst G. **1999**. Antibodies against human hsp60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement activating ability. *Int Immunol* 11:1363-1370
- III. Uray K, Hudecz F, Füst G, Prohászka Z. **2003**. Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors. *Int Immunol* 15(10):1229-1236
- IV. Veres A, Szamosi T, Ablonczy M, Szamosi T Jr, Singh M, Karádi I, Romics L, Füst G, Prohászka Z. **2002**. Complement activating antibodies against the human 60 kDa heat shock protein as a new independent family risk factor of coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 32(6):405-410
- V. Prohászka Z, Bánhegyi D, Ujhelyi E, Karádi I, and Füst G. **1998**. Antibodies against 60kDa heat shock proteins in human immunodeficiency virus infection. In: Stress of Life from Molecules to Man. (ed.: P. Csermely) *Ann of NY Acad Sci* 851:94-98
- VI. Horváth L, Cervenak L, Fekete B, Jakab L, Prohászka Z, Romics L, Singh M, Dahan MR, Füst G. **2001**. Levels of antibodies against C1q and 60 kD family of heat-shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. *Immunol Lett* 75:103-109
- VII. Prohászka Z, Dahan MR, Süsal C, Daniel V, Szilávik J, Bánhegyi D, Nagy K, Várkonyi V, Horváth A, Ujhelyi E, Tóth FD, Uray K, Hudecz F, Füst G. **1999**. C1q autoantibodies in HIV infection: Correlation to elevated levels of autoantibodies against 60 kDa heat-shock proteins. *Clin Immunol* 90(2):247-255
- VIII. Jánoskúti L, Horváth L, Szebeni A, Császár A, Karádi I, Fenyvesi T, Romics L, Füst G, Prohászka Z. **1999**. A 60 kDa-os hő sokkfehérjék elleni antitestek szintjének változása akut coronaria-szindrómában szenvedő betegekben. *Magyar Belorv Arch* 52:400-405
- IX. Veres A, Füst G, Smieja M, McQueen M, Horváth A, Yi Q, Bíró A, Pogue J, Romics L, Karádi I, Singh M, Gnarpe J, Prohászka Z, Yusuf S; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. **2002**. Relationship of anti-60 kDa heat shock protein and anti-cholesterol antibodies to cardiovascular events. *Circulation* 106(22):2775-2780
- X. Kramer J, Harcos P, Prohászka Z, Horváth L, Karádi I, Singh M, Császár A, Romics L, Füst G. **2000** Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases. *Stroke* 31:2648-2652
- XI. Horváth L, Cervenak L, Oroszlán M, Prohászka Z, Uray K, Hudecz F, Baranyi É, Madácsy L, Singh M, Romics L, Füst G, Pánczél P. **2002**. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett* 80(3):155-62
- XII. Kalabay L, Fekete B, Cziráj L, Horváth L, Dahan MR, Veres A, Fónyad G, Horváth A, Viczián Á, Singh M, Hoffer I, Füst G, Romics L, Prohászka Z. **2002**. *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial HSP65 but not to human human HSP60. *Helicobacter* 7(4):250-256

- XIII. Bene L, Füst G, Huszti Z, Hernádi Zs, Fekete B, Mészáros M, Veres A, Kovács Á, Miklós K, Singh M, Romics L, Prohászka Z. **2002**. Impaired humoral immune response against mycobacterial 65 kDa heat shock protein (hsp65) in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 47(7):1432-1437
- XIV. Huszti Z, Bene L, Kovács A, Fekete B, Füst G, Romics L, Singh M, Prohászka Z. **2004**. Low levels of antibodies against E. coli and mycobacterial 65kDa heat shock proteins in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 53(10):551-5
- XV. Veres A, Prohászka Z, Kilpinen S, Singh M, Füst G, Mikko Hurme M. **2002**. The promoter polymorphism of the IL-6 gene is associated with levels of antibodies to 60 kDa heat-shock proteins. *Immunogenetics* 53:851-6
- XVI. Pandey JP, Prohászka Z, Veres A, Füst G and Hurme M. **2004**. Epistatic effects of genes encoding immunoglobulin GM allotypes and interleukin-6 on the production of autoantibodies to 60-kDa and 65-kDa heat shock proteins. *Genes and Immunity* 5(1):68-71
- XVII. Burian K, Kis Z, Virok D, Endrész V, Prohászka Z, Duba J, Berencsi K, Boda K, Romics L, Füst G, Gönczöl E. **2001**. Independent and joint effects of antibodies to human heat-shock protein 60 and Chlamydia pneumoniae infection in the development of coronary atherosclerosis. *Circulation* 103:1503-1508
- XVIII. Rugonfalvi-Kiss S, Endrész V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohászka Z, Karádi I, Romics L, Gönczöl E, Füst G, Garred P. **2002**. Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation* 106:1071-1076
- XIX. Prohászka Zoltán. **2003**. A hő sokkfehérjék, mint az immunválasz dajkái. Életünk és a szükséges stressz. *Orv Hetil* 144(27):1331-9
- XX. Prohászka Z and Füst G. **2004**. Immunological aspects of heat shock proteins - the optimum stress of life. *Mo Immunol* 41(1):29-44
- XXI. Kalina A, Császár A, Füst G, Nagy B, Szalai C, Karádi I, Duba J, Prohászka Z, Horváth L, Dieplinger H. **2001**. The association of serum lipoprotein(a) size and TTTTA0n) polymorphism with coronary heart disease. *Clin Chimica Acta* 309:45-51
- XXII. Jánoskúti L, Förhéc Z, Hosszúfalusi N, Kleiber M, Walentin S, Bálint O, Duba J, Rugonfalvi-Kiss S, Romics L, Karádi I, Füst G, Prohászka Z. **2005**. High levels of C-reactive protein with low total cholesterol concentrations additively predict all-cause mortality in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 35(2):104-11

A PhD értekezés beadása óta megjelent egyéb közlemények

Könyvfejezetek

Az alkalmazott statisztikai módszerek leírása

Rövidítések jegyzéke

Összefoglalás

Bevezetés, a dolgozat felépítése

Doktori értekezésemben a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában valamint kollaborációk keretében 1995 és 2005 között végzett kísérletes munka eredményeit foglalom össze. Eredeti célkitűzésünk a 60 kDa-os hősokkfehérjék elleni antitestek vizsgálata volt atherosclerosisban. Az értekezésben ehhez a témához szorosan kapcsolódó 21 saját cikknek az eredményei vannak feltüntetve. A dolgozat felépítése kronológiai sorrendet követ, 4 fejezetre tagozódik. A 4 fejezet önálló szerkesztésű, mindegyikben található rövid bevezetés, a célkitűzések és az eredmények ismertetése majd összefoglalása, és diszkusszió. A 4. fejezetet követi az új eredmények összefoglalása és következtetések bemutatása. A fejezetek egymásra épülnek, tükrözik munkánk valódi lefolyását, vagyis azt a sorrendet, ahogy eredményeink újabb hipotéziseket és kísérleteket szültek. A mellékletben megtalálható annak a 21 saját cikknek a különlenyomata, amelynek eredményei a dolgozatban áttekintésre, összegzésre kerülnek. Ezeket a szövegben római számokkal ellátott hivatkozások jelzik. A melléklet cikkei a szövegben való felbukkanásuk sorrendjében vannak összerendezve.

A felesleges ismétlések csökkentése céljából igyekeztem kerülni olyan eredmények újbóli bemutatását ábrakon vagy táblázatokban, melyek már publikálásra kerültek és a melléklet cikkeiben olvashatók. Ugyanezt az elvet követtem az alkalmazott metodikák leírásánál is. Csak az alapvető fontosságú adatok kerülnek ismételt bemutatásra a dolgozatban, a legtöbb helyen a melléklet cikkeiben olvasható leírásokra, ábrákra és táblázatokra történik csak hivatkozás. A dolgozat legtöbb ábrája és táblázata eddig nem publikált eredményt mutat be. Tekintettel arra, hogy néhány ábra egész oldalas (5, 7, 16), és magyarázatukhoz akár több oldalas szöveg is tartozik, a könnyebb követhetőség érdekében ezek az ábrák ismételve megtalálhatók a melléklet végén. Szintén a melléklet végén található függelékben olvasható az alkalmazott statisztikai módszerek leírása.

1, Az atherosclerosis patogenezise

Bevezetés

Az artériák fala 3 rétegből épül fel: az *intimát* a lumen felé egy endothelsejtes réteg határolja, ez alatt kötőszöveti sejtes elemek, elasztikus és kollagénrostok helyezkednek el, melyeket a média felé lap szerint összerendezett rostokból kialakult fenestrált membrán határol. A középső rétegben (*média*) jelentős mennyiségű simaizomsejt található finom kötőszöveti és amorf sejtközzötti állományba ágyazottan. Az artériák külső, laza, rostos rétege (*tunica adventitia*) tartalmazza a tápláló ereket (vasa vasorum). Az intima megvastagodásával, az érfal megkeményedésével járó folyamatot arteriosclerosisnak nevezzük, melyet az erek rugalmasságának megszűnése, az intima mononukleáris sejtes infiltrációja és a sejtközzötti állomány felszaporodása jellemez. Az atherosclerosis az arteriosclerosis speciális formája, jellegzetességét az ún. habos sejtek adják. A habos sejtek lipidekkel feltöltött szöveti makrofágok, melyek tartalmukat ki is bocsáthatják lehetőséget teremtve ezáltal koleszterin kristályok kialakulására. Az érfalakban ekkor zsíros-törmelékes tartalmú *plakkok* (léziók) keletkeznek, melyeket a lumen felé egy sejtes elemeket és kötőszöveti állományt tartalmazó ún. fibrózus sapka határol. A fibrózus sapka a korábbi intima átalakulásával jön létre. A plakk belsejében a - rostokban és mukopoliszacharidokban gazdag - sejtközzötti állomány területén calcificatio, elmeszesedés is kialakulhat. Amennyiben a plakk a lumen felé domborodik, leszűkíti az ér keresztmetszetét és akadályozza a vér áramlását (*stenosis*). Klinikailag ekkor a véráramlás csökkenését ischaemiás szindrómák megjelenése kíséri. Amennyiben a plakkot határoló fibrózus sapka elvékonyodik és megreped, felszínén vérrög keletkezik, ami az ér lumenét teljesen elzárhatja (*occlusio*). Ekkor hirtelen szöveti nekrozissal és heves klinikai jelekkel kísért infarktus alakul ki azon a területen, melyen a vérellátás megszűnt.

Az atherosclerosis (mely fogalmat dolgozatomban egységesen használom az erek megkeményedésével járó és típusos klinikai formákban manifestálódó kórfolyamat megnevezésére) etiopatogenezise régóta vitatott kérdés. Csaknem igaz ma is, amit Ritoók Zsigmond 1896-ban az Orvosi Hetilapban erről a kérdéstről írt: „Az arterio-sclerosis, mely egyik legelterjedtebb betegség, sőt bizonyos korban csaknem physiologikus állapot, még ma is egész sereg vitás, vagy egyáltalában nem is tanulmányozott kérdést tartalmaz úgy aetiologiájára, mint fejlődési módja, kórbonczana és következményeire nézve. Hogy mennyi itt a felderítendő kérdés, legfeltűnőbben bizonyítja a sok nézeteltérés a bántalom kórbonczanában”. Majd így folytatja: „...még ma sincs teljesen eldöntve, hogy a folyamat lobos-e, vagy degeneratív” (Ritoók, 1896). A cikk megjelenése óta eltelt 109 év a

tárgykörben átláthatatlan mennyiségű új adatot zúdított a gyakorló orvosokra és kutatókra. Az bizonyos, hogy az atherosclerosis és a következményeként kialakuló szív- és érrendszeri megbetegedések multifaktoriális betegségek, vagyis a genetikai predispozíció mellett környezeti tényezők (klasszikus rizikófaktorok) hatására alakulnak ki. Az elmúlt évtizedekben jól felismerhető és követhető volt az a törekvés, hogy az atherosclerosis etiopatogenezisét egy elméletben próbálták meg összegezni, követni és levezetni. Korunk *genomikus szemléletű orvoslása* azonban megmutatta, hogy ezt nem lehet megtenni. Ennek az oka, hogy mai tudásunk szerint nem lehet a genetikai veszélyeztetettséget egyértelműen definiálni, ugyanis feltehetően nem egy-egy gén eltéréséről (hibájáról vagy polimorfizmusáról) van szó, amely atherosclerosisra hajlamosít, hanem számos (akár néhány száz vagy ezer) génvariáns adott együttes előfordulásáról. A lehetséges kombinációk csillagászati száma mai módszereinkkel populációs szinten nem vizsgálható, így egyhamar nem várható, hogy egyszerű módszerekkel felmérhető lesz az atherosclerosisra való fogékonyság genetikai alapon. Ugyanakkor az eddigi, klasszikus genetikai módszerekkel tett megfigyelések eredményei irányadóak (ezek legfőképpen a lipidanyagcserére vonatkoznak), és jelzik, hogy mely biokémiai útvonalak mentén kell keresnünk az érintett tényezőket. Hasonló elvi megfontolás érvényes a környezeti tényezők vonatkozásában is, melyek szintén kölcsönhatásban állnak egymással, továbbá térben, időben és populációról populációra változnak. E két elméleti megfontolás támasztja alá azt a nézetet, hogy indokolt különféle mechanizmusokat keresni és ezeknek megfelelő teóriákat felállítani az atherosclerosis kialakulásának magyarázatára, melyek természetüknél fogva hasonlóak vagy eltérőek lehetnek a vizsgált populáció vagy állatmodell sajátosságai miatt. Ezek az eltérő elméletek egymást kiegészítve, kellő értékeléssel és körültekintéssel együttesen adhatják azt az összképet, melyet az atherosclerosis valósághoz közeli etiopatogeneziseként elfogadhatunk. Az alábbiakban ezek közül néhányat áttekintek, a dolgozat tárgya szerint hangsúlyt helyezve az immunológiához tartozó elméletekre.

Az atherosclerosis kialakulását magyarázó klasszikus elméletek

Az 1950-60-as években, főleg az Amerikai Egyesült Államokban végzett nagy, populációs vizsgálatok azonosították az atherosclerosis klasszikus rizikófaktorait, úm. előrehaladott életkor, férfi nem, pozitív családi anamnézis, magasvérnyomás betegség, dohányzás (cigaretta), cukorbetegség, magas szérum koleszterinszint (emelkedett low-density lipoprotein [LDL]; csökkent high-density lipoprotein [HDL]), elhízás, fizikai inaktivitás, és A-típusú személyiség. A legismertebb ilyen vizsgálat a Framingham Heart Study (The Framingham Heart Study, 1966), melynek eredményeit felhasználva (és folyamatosan frissítve) a

gyakorlatban is jól használható táblázatokat szerkesztettek. Ezek segítségével egy adott egészséges ember kardiovaszkuláris rizikója (annak valószínűsége, hogy az elkövetkező 5 évben valamely kardiovaszkuláris esemény nála bekövetkezzon) pontosan becsülhető. Örvendetes, hogy a Framingham rizikó táblázatok európai (Prevention of coronary heart disease, 1994, 1998), sőt magyarországi adatokhoz illesztett változata is elkészült (Pados, 2004). Kétségbevonhatatlan tény, hogy a Framingham Heart Study és az azt követő populációs vizsgálatok (mint pl. a „Seven Countries Study”, [Dawber, 1970]) – nagyon helyesen – ráirányították a figyelmet a rossz táplálkozási szokásokra valamint a helytelen életmódra, és az ennek nyomán megfogalmazott ajánlások és populációs szintű lépések (pl. National Cholesterol Education Program az USA-ban, <http://www.nhlbi.nih.gov/about/ncep/>) jelentősen hozzájárultak az atheroscleroticus érbetegségek morbiditásának és mortalitásának csökkenéséhez.

A klasszikus rizikófaktorok azonosítását követte az atherosclerosis ún. *lipid elméletének* megfogalmazása, mely szerint a plakkok kialakulásának és fejlődésének első lépése a magas koleszterin tartalmú lipoproteinek (elsősorban LDL) bejutása (infiltrálódása) a subendotheliális rétegbe (Walton, 1975). Az érfalban szekvesztrálódott partikulumok kémiai változásoknak (elsősorban oxidációnak) esnek áldozatul, és ennél fogva szövetkárosító hatást fejtenek ki, azaz monocita és simaizomsejt infiltrációt, majd differenciálódást indukálnak. Lényeges elem, hogy a makrofággá differenciálódott monociták a felszínükön LDL és scavenger receptorokat is expresszálnak. Míg az LDL receptorok egy végszabályozott folyamat során juttatják a sejtekbe az LDL-t (a felvétel bizonyos szint után szaturálódik és a további aktivitás gátlódik), addig a scavenger receptorok „utcaseprő” funkciójukat betöltve addig működnek (expresszálódnak), amíg LDL van a környezetben. Fontos továbbá az a tény is, hogy a scavenger receptorok az LDL módosított formáit is képesek bejuttatni a makrofágokba, melyek ezáltal koleszterinnel túltöltődnek, habos sejtekké alakulnak. A habos sejtek a trombocitákkal együtt aktiválják és migrációra készítetik a média simaizomsejtjeit, melyek szintén az intimába vándorolnak és aktiválódnak.

A lipid elmélet amellett, hogy jól magyarázta a magas koleszterinszint atherogén hatását, két alapvető mechanizmusra nem adott magyarázatot. Az egyik az, hogy milyen módon jut át a sejtbioológiai értelemben nagy (18-28 nm) LDL partikulum a zárt endothel rétegen. A másik pedig annak hiányossága, hogy a lipid elmélet nem törekedett összegezni az atherosclerosis multifaktoriális jellegéből adódó sokszínűséget, túlságosan csak a koleszterinre koncentrált. Ezért jelentett lényeges előrelépést a sérülésre adott válasz (*response to injury*) elmélet megfogalmazása (Ross és Glomset, 1973) melyszerint az atherosclerosis kezdeti lépése az

intimát határoló endothel réteg fizikai sérülése (denudálódása). Később a sérülés fogalma az új eredmények tükrében funkcionális értelmet nyert. Ma inkább *endothel diszfunkció* név alatt foglalható össze az a jelenség, melynek során az endothel réteg integritása sérül, permeabilitása növekszik, antitrombotikus felszíne károsodik, sejtaktiváció és proliferáció indul be, valamint csökken az erek válaszképességét szabályozó (főleg nitrogén-monoxid vezérelte) funkció (Lerman, 2005). Ennek a komplex folyamatnak az eredményeként az endothel réteg átjárhatóvá válik a lipoproteinekkal és más plazma összetevőkkel szemben, így ezek passzívan vándorolhatnak az intima területére. Tekintettel arra, hogy az évek során csaknem az összes klasszikus rizikófaktorról ki lehetett mutatni, hogy milyen mechanizmussal okozhat endothel diszfunkciót, ez az elmélet alkalmas arra is, hogy integrálja a betegség multifaktoriális etiológiájában rejlő sokszínűséget.

Ismert továbbá az ún. *monoklonális hipotézis* is az atherosclerosis magyarázatára. Ennek lényege a média simaizomsejtjeinek fokozott burjánzása, aktiváltsága és intimába vándorlása. Kétségtelen tény, hogy a simaizomsejtek megjelennek és aktiváltak az intimában, azonban a mono- vagy oligoklonális burjánzást alátámasztó, egybehangzó irodalmi adatok nem jelentek meg az elmúlt években.

Az atherosclerosis mint gyulladásos betegség

A 90-es évek elejére világossá vált, hogy a koleszterinszint populációs szintű csökkentése és a kedvező életmódbeli változások (a dohányzás abbahagyása és a fizikai aktivitás jelentős növelése) jelentős javulást okoztak, azonban nem vezettek el az atherosclerosis problémájának megoldásához, a betegség továbbra is vezette a halálozási statisztikát az USA-ban. Ismertté és elfogadottá vált továbbá az is, hogy a léziók legkorábban kimutatható formája (az ún. *zsíros csíkok*, fatty streak) tisztán gyulladásos természetű elváltozás, melyet aktivált makrofágok és T-sejtek alkotnak (Xu, 1990, Stary, 1994). Ha a zsíros csíkok hiperkoleszterinémiás személyekben jelennek meg, akkor a mononukleáris sejtes infiltrációt lipidek lerakódása is kíséri (Simionescu, 1986 és Napoli C, 1997). A gyulladásos jelenségek végig részt vesznek az atheroscleroticus plakk fejlődésének minden szakaszában.

Alapvető kérdés, hogy mi idézi elő a sejtes elemek bevándorlását az intimába, melyet mai ismereteink szerint az atherosclerosis legkorábbi stádiumának tekinthetünk. A jelenség az endothel diszfunkció kialakulásával magyarázható, melynek kulcseleme az adhézión molekulák megjelenése az endothelsejtek felszínén. A fehérvérsejtek és trombociták kitapadhatnak, majd az endothelsejtes réteg permeabilitásának növekedésével lehetővé válik a sejtes elemek átvándorlása (transzmigráció) az intimába. A gyulladásos sejtek

felhalmozódnak, és amennyiben az endothel diszfunkciót kiváltó tényező nem szűnik meg, az intimában sejtaktiváció, további fehérvérsejt bevándorlás történik, kialakul a *kötés lézió*. Erre a szakaszra aktív sejttevékenység, hidrolitikus enzimek jelenléte, citokinek, kemokinek és növekedési faktorok szekréciója jellemző. Az aktív sejttevékenység eredményeként szöveti károsodás, akár nekrozis is bekövetkezhet, ami tovább fokozza a gyulladásos- és simaizomsejtek beáramlását. A gyulladást, szövetkárosodást fibrózis követi, a zsíros, elhalt szövetanyagot rostos alapállományba ágyazottan aktivált simaizom elemeket tartalmazó „sapka” borítja. Ebben a stádiumban előrehaladott, *komplikált lézióról* beszélünk, mely jelentősen beszűkítheti az erek lumenét.

Számos tényezőről feltételezik, hogy endothel diszfunkciót képes létrehozni, és ezáltal gyulladást indukálni. Ezek között a legtöbb figyelem az *LDL partikulumra* és annak módosított (oxidált, glikált, aggregált és immunkomplexbe ágyazott) formáira irányult. A makrofágok módosított formákat is képesek felvenni scavenger receptoraikon keresztül, ami fokozza aktivációjukat. A makrofágok aktivációja és sejttevékenysége kontrollálatlan folyamatokat indíthat be, melyek lényege a lipoproteinek további módosulása, sejtek beáramlása és aktiválódása. A dohányzás okozta szabadgyök képződés jelentősen fokozhatja, az antioxidánsok (pl. E vitamin) viszont lassíthatják ezt a jelenséget.

A *hipertóniát* gyakran kíséri az angiotenzin II szintjének emelkedése, ami vasoconstrictor hatása mellett számos más ponton is kölcsönhatásba lép az endothel- és simaizomsejtekkel. Foszfolipáz C aktiváló hatása révén növeli a simaizomsejtek aktiváltságát, és fokozza proliferációjukat. A lipoxigenáz termelést is növeli, ami az LDL oxidációját fokozza. A hipertóniában gyakran fellépő érfa-li nyíróerő kedvezőtlen hatásai közé tartozik az endothelsejtek adhéziós molekula expressziójának fokozása, ami szintén hozzájárul a gyulladásos jelenségek kialakulásához.

Diabetes mellitusban glikált fehérjék jelenhetnek meg a keringésben és a szövetek között is, melyek nem-enzimatisz uton alakulnak ki. Szokták ezeket a cukor oldalláncokat tartalmazó fehérjéket angol betűszóval AGE-nek is rövidíteni (advanced glycated end-products). AGE természetű fehérjék erős aktiváló hatást gyakorolnak endothelsejtekre és makrofágokra, fokozódik a proinflammatorikus citokinek és növekedési faktorok szekréciója. Az AGE receptora (RAGE) a scavenger receptor családba tartozik. A diabetes gyakran metabolikus szindrómával is együtt jár, melyben az atherogén lipid profil (alacsony HDL mellett magas VLDL, LDL és triglicerid szintek), és a zsírszövet által termelt IL-6 és TNF-alfa

nagymértékben elősegítheti a gyulladásos jelenségek fokozódását, ami hajlamosít a vaszkuláris szövődmények megjelenésére.

Fertőző ágensekről (elsősorban herpeszvírusokról és a *Chlamydomphila* genusba tartozó intracellulárisan szaporodó baktériumokról) is felmerült, hogy szerepet játszhatnak az érfalban kimutatható gyulladás kiváltásában vagy súlyosbításában, azonban meggyőző, állatkísérletekkel is alátámasztható, ismételhető eredmények nem születtek ezzel kapcsolatban. Mint azonban az a későbbiekben részletesen ismertetésre kerül, genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatása befolyásolhatja az infekciós tényezők szerepét atherosclerosisban.

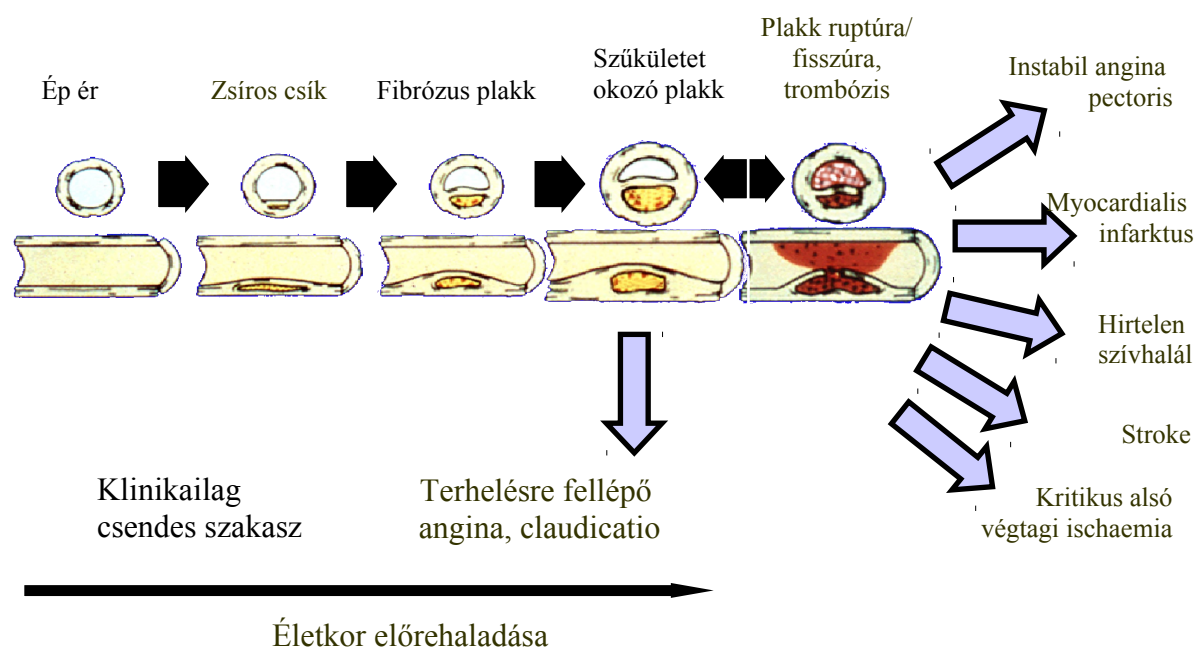
Az atherosclerost kísérő gyulladásos jelenségekkel kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy ezek a folyamatok a szervezet elhárító rendszerének erőfeszítései az erek integritásának helyreállítására. A gyulladásos kaszkádot beindító okok azonban gyakran nem, vagy csak részlegesen eliminálhatók. Továbbá ha ezen okok által létrehozott szöveti károsodás elért egy szintet, a szervezet elhárító válasza nem képes *restitutio ad integrum* kijavítani a szöveti struktúrát. Ennélfogva a gyulladást jelző molekulák (citokinek, kemokinek, klasszikus akut fázis fehérjék) integráltan jelezhetik a szervezet állapotát, vagyis a károsító tényezők és a szöveti károsodás összesített mértékét. Igen heves vita zajlik az irodalomban arról, hogy a gyulladást jelző molekulák (pl. C-reaktív fehérje [CRP]) passzív jelzői, vagy aktív mediátorai az atheroscleroticus érbetegségeknek (Pepys, 2003), és hogy milyen mértékben képesek javítani a kardiovaszkuláris rizikóbecslést a klinikai gyakorlatban (Danesh, 2004).

Az atheroscleroticus érbetegségek klinikai megjelenése és lefolyása

Általánosan elfogadott nézet, hogy a nagyereket (idetartoznak az elasztikus és izmos típusú artériák) testszerte egyformán éri az atherosclerost kiváltó hatások, és a folyamat több érterületen párhuzamosan zajlik. A beszűkült vagy elzáródott erek ellátási területének megfelelően típusos klinikai tünetekkel jelentkeznek az *atheroscleroticus érbetegségek*. Leggyakrabban a szív koszorúerei (angina pectoris, szívizominfarktus) és a nyaki verőerek (szélütés vagy stroke) érintettek, szintén gyakori azonban az alsó végtagok (claudicatio intermittens), a veseartériák (hipertónia) és a beleket is ellátó értörzs (angina abdominalis) érintettsége. Lényeges különbség figyelhető meg azonban pl. az akut myocardialis infarctus és a stroke rizikófaktoraiban és molekuláris mechanizmusában. A stroke átlagosan 10 évvel később jelenik meg az érintettekben, gyakrabban jelentkezik hipertóniásokban és nőkben, és nem mutat olyan szoros összefüggést az emelkedett szérum koleszterinszinttel, mint a szívizominfarktus. Saját vizsgálatunk is igazolt további eltérő tényezőket a két betegség

között (Füst, 1999). Indokolt tehát elkülönített csoportoknak tekinteni az egyes szervek atheroscleroticus érbetegségeit, és külön vizsgálni azokat.

A plakkok kialakulása és fejlődése jól elkülöníthető stádiumokra bontható (ld. 1. ábra). A zsíros csíkok és fibrózus plakkok legtöbbször nem okoznak klinikai tüneteket, azonban



1. ábra: Az atherosclerosis lefolyása és egyes klinikai megjelenési formái.
 Forrás: <http://www.nhlbi.nih.gov/about/ncep/> (P. Ganz után, módosításokkal)

terhelésre a funkcionális károsodás miatt már ebben a szakaszban is felléphetnek a típusos tünetek. A plakkokat határoló fibrózus sapka igen aktív metabolizmussal jellemezhető, dinamikus változó szöveti egység, melynek aktuális állapota, sérülése határozza meg a plakk további sorsát. Ha a *fibrózus sapka* vastag, stabil, benne kevés, és nem aktivált sejtes elem található, akkor kicsi a valószínűsége a megrepedésének. A plakk stabilitását növelheti,

ha diétás vagy gyógyszeres kezeléssel a plakk belsejének lipid tartalmát (ennél fogva a plakk méretét, sejtjeinek aktiváltságát és káros tevékenységét) csökkenteni lehet. Ha azonban a plakk területén aktív gyulladás zajlik, apoptózis következhet be, ami elvékonyíthatja a fibrózus sapkát. Ehhez a folyamathoz lényegesen hozzájárulnak az aktív makrofágokból szabadba kerülő szöveti metalloproteinázok (kollagenázok, elasztáz, stromelizin, mátrix metalloproteináz). A sérülékeny, elvékonyodott plakk (pl. az a. carotison ultrahanggal vizsgálva) sokszor inhomogén, csekély mértékű szűkületet okoz, ami miatt angiográfiával nehezen diagnosztizálható. Az elvékonyodott fibrózus sapka felszíne gyakran sérül, erodálódik és akár át is lyukadhat (*fissura*). A sérülés területén a szabad szöveti alapállomány hatására trombocita trombus keletkezik, melyet az aktiválódó koagulációs kaszkád zártrombussá alakít. Klinikailag ilyenkor akut ischaemiás szindrómák jelennek meg, az ér ellátási területén necrosis, infarktus alakulhat ki. Az érintett betegek sorsa ebben a stádiumban az ún. rekanalizációs, intervenciós eljárások sikerén múlik, mely területen (és az ellátás megszervezésén is) nagymértékű haladás tapasztalható az elmúlt évtizedekben.

Autoimmunitás, mint az atheroscleroticus folyamat kiváltója

Amikor kutatómunkámat 1995-ben megkezdtem, egy új hipotézis látott napvilágot az atherosclerosis kezdeti lépéseire vonatkozóan (Wick, 1995). A Georg Wick által vezetett innsbrucki kutatócsoport közel 10 év, főleg nyulakon végzett patológiai, majd humán klinikai vizsgálatokban is megerősített eredményei szerint a legkorábbi léziók területén kimutatható első sejtek T-sejtek, melyeket kezdettől fogva antitestek és komplement fragmensek vesznek körül az intimában. Immunológiai szempontból a gyulladásos folyamatot *kiváltó tényezők* azonosítása a legfontosabb feladat. Több külső (virális és bakteriális fehérjék) és saját (megváltozott LDL, béta-2 glikoprotein 1, 60 kDa-os hősokkfehérje [Hsp60]) antigén is felmerült mint kiváltó faktor. Wick és munkatársai szerint azonban a Hsp60 képezi az erek falát károsító immunválasz fő célpontját (ld. részletesen lejjebb). Kutatócsoportunk klinikai vizsgálatot szervezett a Hsp60 elleni humorális immunitás vizsgálatára koronária betegségben. Célunk az innsbrucki munkacsoport elméletének független utánvizsgálata, esetleg megerősítése volt.

A 60 kDa-os hősokkfehérje család jellemzői

A hősokkfehérjéket hagyományos módon molekulatömegük szerint osztályozzák. A legjobban ismert hősokkfehérjék a 110, 90, 70, és 60 kDa molekulatömegű hősokkfehérjék családjába tartoznak (1. táblázat).

Ezek a fő hősokkfehérjék hősokk nélkül 37°C-on expresszálnak. Külön csoportot képeznek a minor hősokkfehérjék, ide tartoznak a 34, 47, 56, 75, 78, 94 és 174 kDa molekulatömegű glükózregulált fehérjék (glucose regulated proteins [grp]), melyek glükóz megvonás hatására termelődnek.

1. táblázat: A hősokkfehérjék legjobban ismert családjai*

Eukarióta (prokarióta) család	A gén jelölése	A gén neve	A gén lokalizációja	A Hsp lokalizációja
Hsp110 (C1P)	HSP105A	110 kDa hősokkfehérje	13q12.3	Citoszol/mag
	HSP105B			
	APG-1	110 kDa hősokkfehérje, ozmotikus stresszfehérje 94	4q28	Citoszol/mag
Hsp90 (HtpG)	APG-2/HSPA4	70 kDa hősokkfehérje 4 (HSP apg-2)	5q31.1-q31.2	Citoszol/mag
	HSPCA	90 kDa hősokkfehérje 1, alfa	14q32.3 (4q3.5, 11p14.1-14.2, 1q212-q22, pseudogének)	Citoszol/mag
	HSPCB	90 kDa hősokkfehérje 1, beta	6p12 (4q21-q25, 15pter-q21, pseudogének)	Citoszol/mag
Hsp70 (DnaK)	TRAP1	75 kDa hősokkfehérje	16p13.3	Mitokondrium
	HSPA1A	70 kDa hősokkfehérje 1A	6p21.3	Citoszol/mag
	HSPA1B	70 kDa hősokkfehérje 1B	6p21.3	Citoszol/mag
	HSPA1L	70 kDa hősokkfehérje-szerű 1	6p21.3	Citoszol/mag
	HSPA2	70 kDa hősokkfehérje 2	14q24.1	Citoszol/mag
	HSPA3	70 kDa hősokkfehérje 3	21	Citoszol/mag
	HSPA5	70 kDa hősokkfehérje 5 (glukóz regulált fehérje, 78 kDa, grp78, BiP)	9q33-q34.1	Endoplazmás retikulum
	HSPA6	70 kDa hősokkfehérje 6 (HSP70B')	1cen-qter	Citoszol/mag
	HSPA7	70 kDa hősokkfehérje 7 (HSP70B)	1q23.1	Citoszol/mag
	HSPA8	70 kDa hősokkfehérje (HSC70)	11q23.3-q25	Citoszol/mag
Hsp60 (GroEL)	HSPA9A	70 kDa hősokkfehérje 9A (mortalin-1)	Emberben nem ismert, egérben 18-as kromoszóma	Citoszol/mag
	HSPA9B	70 kDa hősokkfehérje 9B (mortalin-2)	5q31.1	Citoszol/mag
	HSPD1	60 kDa hősokkfehérje (chaperonin)	12q12-13.2	Mitokondrium, Citoszol?

* Kiang, 1998 és Sonna, 2002 alapján, módosításokkal

A hősokkfehérjék egy harmadik csoportját a kisméretű, mintegy 20 kDa molekulatömegű hősokkfehérjék alkotják. A hősokkfehérjék fehérje természetükből kifolyólag három fő biokémiai szereppel rendelkeznek. *Dajkafehérje* (molekuláris chaperone) aktivitásuk révén meggátolják a denaturálódott fehérjék összetapadását, és segítik visszanyerni a denaturált fehérjék natív konformációját. Néhány dajkafehérje funkciójú hősokkfehérje nyugalmi helyzetben is részt vesz a naszcens polipeptidek natív konformációjának létrehozásában a fehérjeszintézis során. Továbbá annak köszönhetően, hogy a fehérjéket speciális konformációban képesek tartani, számos sejtszabályozási folyamatban, mint például a sejtciklus kontrollban, a szteroid és D-vitamin-receptor feldolgozásban, és az antigén prezentációban vesznek részt. A legrégebben ismert, dajkafehérje aktivitással rendelkező hősokkfehérjék a Hsp70, Hsp90 és a Hsp60. A hősokkfehérjék második szerepe a sejt *redox állapotának*

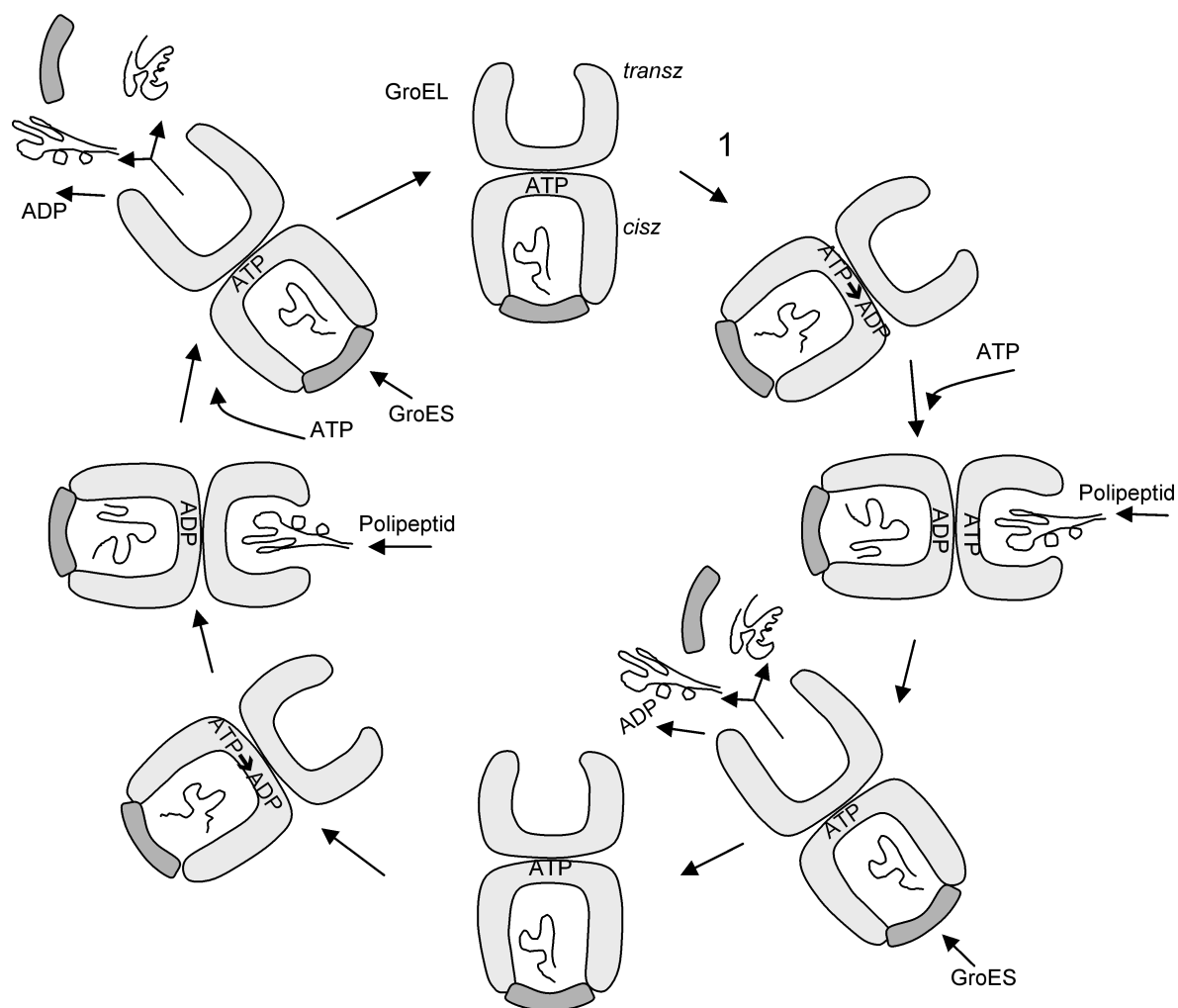
szabályozása, melynek legjobb példáját a Hsp32, ismertebb nevén a hemoxigenáz-1 nyújtja.

A harmadik alapvető biokémiai szerep a *fehérje turnover* szabályozása. Példaképpen az ubiquitin említhető, mely nyugalmi körülmények között is expresszálódik a sejtben, hősokk hatására nagyobb mennyiségben termelődik, és molekuláris toldalékként a proteaszómában lebontásra kerülő fehérjék kijelölésére szolgál. Az összes felsorolt hősokkfehérje aktivitás ATP igényes folyamat, az ATP hidrolízisét pedig maga a hősokkfehérje katalizálja.

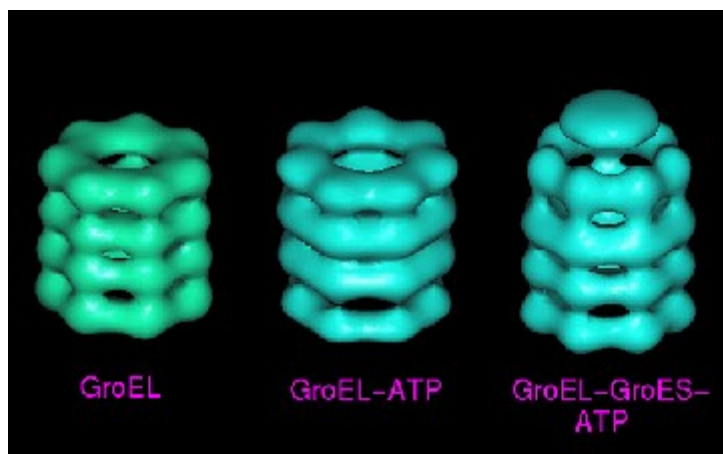
A Hsp60 családot két részre lehet bontani: az eukarióta mitokondriumban és baktériumokban található, 2x7 tagból álló, üreget formáló fehérjekomplexet nevezzük I. típusú Hsp60-nak (chaperonin), míg az archebaktériumokban és az eukarióta sejtek citoplazmájában helyet foglaló, 8 alegységből álló makromolekulát II. típusú Hsp60-nak. Jelen dolgozatban az I. típusú Hsp60-ról lesz szó. Ez a fehérjecsalád rendkívüli konzerváltsággal őrződött meg az evolúció során, hiányában a sejtek (Briones, 1997) életképessége megszűnik ill. csökkent szintje mellett a szervezet működése nagymértékben romlik (Bozner, 2002). A legtöbbet az *E. coli* GroELS fehérjekomplex működéséről tudunk (Horwich, 1999), ennek fehérjeszerkezeti adatok alapján modellezett felépítését és működését mutatja a 2. ábra.

A térszerkezeti modell szerint a Hsp60 két, alapjánál összeragasztott kosárra emlékeztet (2x7 alegység, tetradecamer), melyhez mint tető, vagy sapka egy 7 monomerből álló GroES komplex kapcsolódik a működés bizonyos fázisaiban. A tető kötődése (és ATP hidrolízis) teszi lehetővé, hogy a GroELS komplex nagyfokú konformációs változáson menjen keresztül, az üreg kitáguljon, a benne található fehérje „szétfeszüljön”, majd a tető leválása után ismét „összeessen”. Ez a molekuláris „húzd meg – ereszd meg” (más szóval folding) teszi lehetővé, hogy a fehérje rövid időn belül megtalálja termodinamikailag stabil állapotát, helyes konformációját.

A



B



2. ábra: A GroEL-GroES chaperon reakcióciklus. **A:** A *cisz-transz* elhelyezkedésű gyűrűkben váltakozva alakul ki a fehérjék tekeredését lehetővé tevő konformáció. A *cisz* gyűrűhöz kapcsolódott ATP-k hidrolízise után (1) újabb ATP-k köthetnek a *transz* gyűrűhöz, ami megnöveli az alapvetően hidrofób belső felszínnel rendelkező belső üreg affinitását helytelen konformációjú, hidrofób felszíneket is mutató fehérjék iránt. A polipeptid ligand kötődését a GroES gyűrű („tető”) kapcsolódása követi, amivel készen áll a tekeredést elősegítő molekula komplex. Az ATP, ligand és tető

kötődését ugyanis nagyfokú konformációs változás követi, a belső üreg szétfeszül, alapvetően hidrofób jellegét vesz fel. Az ATP elbomlása után a tető, majd a módosított konformációjú ligand leválnak, az ADP disszociál, az üreg mérete csökken, felszíne hidrofób lesz, és fogadni tudja a következő ligandot. Jellemző, hogy az adott fehérje csak több ciklus után képes elérni a helyes konformációját, melyre a leválást követő kettős nyíl utal az ábrán. Az ábra a molekula modellek hosszmetzeti, sémás képét mutatja. (Horwich, 1999 alapján, módosításokkal). **B:** A GroEL, GroES molekula komplexek sémás térszerkezeti ábrázolása (Forrás: Chen, 1994).

Ez az alapvető biokémiai működés magyarázza meg azt a tényt, hogy a Hsp60 fehérjével homológ működésű molekulák minden baktériumban és fejlettebb szervezetben megtalálhatók, hiányukra vagy strukturális polimorfizmusukra nincs példa.

A Hsp60 immunológiai sajátosságai

A Hsp60 stresszfehérje viselkedése (fokozott kifejeződése hőmérsékletváltozás hatására) és kórokozók közötti strukturális konzerváltsága képezi az alapját annak, hogy fertőző betegségek során *immundomináns antigénként* viselkedik (Kaufmann, 1990 és Lydyard, 1990). Ezt alátámasztó megfigyeléseket *Mycobacterium*, *Chlamydia* és különféle Gram-pozitív és -negatív bakteriális fertőzések után is leírtak. Eritóp vizsgálattal ki lehetett mutatni, hogy a legerősebb (mind T- mind B-sejtes) immunválasz a Hsp60 specíesek legjobban konzervált struktúrái ellen irányul. Munk és munkatársai (1989) azt is feltérképezték, hogy egészséges felnőttek keringésében kimutatható Hsp60-specifíkus T-sejtek ugyanezeket az eritópokat ismerik fel. A szerzők feltételezése szerint az anti-Hsp60 immunreaktívitas a béltraktus és bőr bakteriális kolonizációjának, a folyamatos antigén ingernek az eredménye. A Hsp60 gyulladásos folyamatokban betöltött szerepére először a 80-as években terelődött figyelem. Az adjuváns arthritis modellben kimutatták, hogy a gyulladt ízületeket infiltráló T-sejtek a mycobacteriális Hsp60 ellen irányulnak (van Eden, 1988). Az első híradás óta több betegségben is leírták Hsp60 reaktív T-sejtek jelenlétét (áttekintésként ld. van Eden, 2005), ezek közé tartozik az I. típ. diabetes mellitus, rheumatoid arthritis és atherosclerosis. Az is bebizonyosodott, hogy a Hsp60 olyan autoantigén, mely képes regulációs immunválaszt is létrehozni, mivel az anti-Hsp60 T-sejtek fenotípusa az említett betegségekben regulátoros volt, és jelenlétük egybeesett a károsító, proinflammatorikus immunválasz lecsendesítésével (összefoglalva ld. van Eden, 2005).

Annak ellenére, hogy több módon is biztosított lehetne emlős szervezetben a Hsp60 immunológiai védelme a centrális tolerancia kialakulása során, számos vizsgálatban ki lehetett mutatni anti-Hsp60 T-sejteket és antitesteket egészséges vagy gyulladásos betegségben szenvedő emberek vérében (Cohen, 1991a). Fischer és munkatársainak egészséges újszülöttek köldökzsinór-vérében is sikerült anti-Hsp60 T-sejteket kimutatnia (Fischer, 1992). Cohen és munkatársai 1991-ben felvetették (Cohen, 1991b), hogy a Hsp60 azok közé a saját antigének közé tartozik, melyeknek a védelmét a szervezet a *perifériás tolerancia* eszközeivel biztosítja (ld. még 2. fejezet). Ma nem ismertek pontosan azok a túlélési szignálok, melyek a tímuszon belül (ahol a centrális tolerancia kialakulása során a Hsp60 nagy mennyiségben megtalálható) az anti-Hsp60 T-sejteket életben tartják.

A Hsp60-nal szembeni perifériás tolerancia egyik lehetősége az, hogy a Hsp60 regulátoros immunválaszt indukál. Ennek egyik alapja az, hogy dendritikus sejtek Toll-szerű receptorokon keresztüli stimulálása Hsp-vel (vagy LPS-sel) nem csupán Th1-jellegű citokinek szekrécióját indítja be, hanem az IL-10-ét is. Az IL-10 regulátoros, a gyulladásos választ ellensúlyozó tulajdonsága újabban fertőzőes modellekben is megerősítést nyert (Stordeur, 1998), melynek kapcsán stressz-citokin névvel is illették. A Hsp-vel szemben kialakuló regulátoros válasz oka lehet a folyamatos Hsp antigén inger a bélcsatorna és a bőr felől, melynek során az aktiválódó T-sejtek regulátoros fenotípust vesznek fel az IL-10 jelenléte és a kostimuláció hiánya miatt. Ezt a hipotézist az adjuváns arthritis modellben tett megfigyelések támasztják alá (Durai M, 2004). A regulátoros anti-Hsp60 T-sejtek maguk is szekretálhatnak IL-10-t (Paul, 2000).

Sokkal kevesebb adat található az irodalomban a hősokkfehérjék perifériás toleranciája és a B-sejtes kompartment kapcsolatáról. Jelen munka eredményei ehhez a területhez szolgáltatnak új eredményeket.

A Hsp60 elleni autoimmunitás és az atherosclerosis kapcsolata

A 80-as évek végén ismertté vált, hogy a legkorábbi, emberben kimutatható atheroscleroticus léziókban a sejtes infiltrátum aktivált T-limfocitákat tartalmaz (Xu, 1989, Xu, 1990). Ugyanez a munkacsoport nyulakban megfigyelte, hogy Hsp65-tel való immunizálás után a típusos helyeken atheroscleroticus plakkok keletkeztek az aortán. Amennyiben az állatok koleszterinben gazdag diétát is kaptak, a léziók irreverzibilisnek mutatkoztak; ha csak immunizálás történt, reverzibilisek maradtak (Xu, 1992). Az immunizált állatokban a léziók területén emelkedett volt a Hsp60 expressziós szintje, az állatok vérében pedig nagyobb mennyiségben jelentek meg Hsp65 reaktív T-sejtek és antitestek. Kimutatták azt is, hogy az anti-Hsp65 antitestek kötődnek a léziók területén az endothelsejtekhez és károsíthatják is azokat (Xu 1993a). Mindezen eredmények alapján humán klinikai vizsgálatot is szervezett az innsbrucki munkacsoport, melynek során 867 egészséges személy esetében végezték el szűrővizsgálati jelleggel az a. carotis állapotának ultrahangos felmérését. A vizsgált személyektől vérminta vétele is történt, melyben meghatározták az anti-*M. bovis* Hsp65 antitestek szintjét. Szignifikáns anti-Hsp65 antitestszint emelkedést találtak azokban, akiknél bármekkora a. carotis plakk volt kimutatható azokhoz képest, akikben nem detektáltak plakkot (Xu 1993b). További vizsgálatokkal a munkacsoport bebizonyította, hogy ezek az anti-Hsp65 antitestek képesek komplementfüggő módon valamint ADCC reakció útján károsítani az endothelsejteket (Schett, 1995). Több vizsgálatban azt is kimutatták, hogy a

Hsp60 humán sejteken is megjelenhet a plazmamembránban (például endothelsejteken citokinek és oxidált LDL, vagy nyíróerő hatására [Amberger, 1997; Hochleitner, 2000]), így az antitestek targetjükkal reagálva akár *in vivo* is kifejthetik károsító hatásukat. A munkacsoport a következők szerint foglalta össze eredményeit (Wick, 2001): a mikrobiális fertőzések elleni védelmet a kórokozók antigénjei (köztük hősokkfehérjék) elleni sejtes és humorális immunválasz biztosítja. Fiziológiai körülmények között az erek falában (az endothel és simaizomsejtek membránján) nem expresszálódnak hősokkfehérjék, emiatt a kórokozók ellen termelődő anti-Hsp antitestek nem károsíthatják keresztreakció révén az erek falát. Amennyiben azonban az erek falát stresszhatás éri (pl. fokozott nyíróerő magasvérnyomás betegségben, vagy oxidált LDL hypercholestrinaemiában), a sejtek membránjában megjelennek a hősokkfehérjék, és a bakteriális Hsp ellen termelődött antitestek károsítják az endothelsejteket. Az endothelsejtek működésének zavara lehetőséget ad atheroscleroticus lézió keletkezésének és öngerjesztő folyamatok beindulásának, melyek végül szűkületet vagy érelzáródást okozó plakkot eredményeznek.

Az anti-Hsp60 autoantitestek és az atherosclerosis kapcsolata – saját vizsgálatok

Az anti-Hsp60 autoantitestek atherosclerosisban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul 1995-ben. Fontosnak éreztük, hogy további érbetegségben és független populációban is vizsgálatra kerüljön az anti-Hsp antitestek szerepe. Igyekeztünk immunológiai szempontokat is érvényesíteni vizsgálatunk tervezésekor. Az antitestek jelenlétét ezért párhuzamosan többféle, humán és bakteriális Hsp60 családba tartozó molekula ellen is megmértük. Ilyen összehasonlító vizsgálatot 1996 előtt nem publikáltak atherosclerostikus érbetegségben. Hangsúlyt fektettünk arra is, hogy elegendő minta kerüljön tárolásra betegeinktől a további vizsgálatokhoz (gyulladásos markerek, genetikai tényezők).

Vizsgálati modellnek a koronária betegséget választottuk, a betegek bevonására az Országos Kardiológiai Intézetben került sor. Mindenki, aki az intézetben by-pass műtéten esett át, 6 hónap elteltével ellenőrző vizsgálaton és állapotfelmérésen vett részt. Vizsgálatunkat (mintavétel és adatgyűjtés) ebben az időpontban végeztük el. 357 beteg került bevonásra, mindnyájuknál >50%-os sztenózis mutatkozott egy vagy több koronária ágon, és az angiográfia után by-pass műtét történt. Beteg-kontroll csoportunkba 67 személy került, esetükben koronária sztenózis nem volt kimutatható, klinikailag stabil angina pectoris és pozitív kerékpár ergometria jellemezte ezt a csoportot, valamint nem volt szükség by-pass operációra. Negatív kontroll csoportunkba egészséges véradókat gyűjtöttünk (321 személy), akikről csak korlátozott mennyiségben álltak rendelkezésünkre klinikai adatok (nem és az

életkor). A csoportok adatait a 2. táblázat mutatja, a vizsgálat és az alkalmazott metodikák részletes leírása a melléklet I. cikkében található.

2. táblázat: A koszorúér betegek és egészséges kontrollok vizsgálati csoportjainak egyes klinikai jellemzői

Változó	By-pass	Beteg-kontroll	Vérado kontroll	p-érték*
Életkor (év)	58 (52-64)	61 (54-67)	47 (43-52)	0,027
Nem (f/n)	273/84	46/21	192/129	0,228
Testtömeg-index (kg/m ²)	28 (26-31)	26 (25-30)	-	0,077
Szérum koleszterin (mmol/l)	6,2 (5,5-7,3)	6,35 (5,5-7,3)	-	0,747
HDL-koleszterin	1,27 (1,1-1,3)	1,3 (1,27-1,32)	-	0,001
LDL-koleszterin	3,96 (3,2-4,8)	4,2 (3,2-4,8)	-	0,505
Triglicerid (mmol/l)	2,1 (1,4-3,1)	1,6 (1,3-2,1)	-	0,01
Soha nem dohányzott	30,3%	42,9%	-	0,106
Dohányzik v. dohányzott	60,7 %	57,1%	-	-

*A p-érték a by-pass és a beteg-kontroll csoportok összehasonlítására vonatkozik.

Eredményeink megerősítették Wick és munkatársai eredeti megfigyelését, hiszen mind a *Mycobacterium bovis* Hsp65, az *E. coli* GroEL és a humán Hsp60 ellen emelkedett mennyiségben találtunk antitesteket (melléklet, I. cikk, 2. táblázat). Tekintettel arra, hogy beteg-kontroll és by-pass csoportok között több klinikai paraméterben is különbség volt, többszörös logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk annak felmérésére, hogy az anti-Hsp60 autoantitestszintek független jelzői-e a súlyos koszorúér betegségnek (3. táblázat).

3. táblázat: A súlyos koronária betegség, az anti-Hsp60 autoantitestek és egyes rizikófaktorok kapcsolatának vizsgálata kiegyenlített, többszörös logisztikus regressziós analízissel

Változó	p-érték
Anti-humán Hsp60	0,0073
Anti- <i>M. bovis</i> Hsp65	0,918
Anti- <i>E. coli</i> GroEL	0,957
Életkor	0,179
Testtömeg-index	0,951
Dohányzás	0,249
HDL-koleszterin	0,006
Triglicerid	0,941

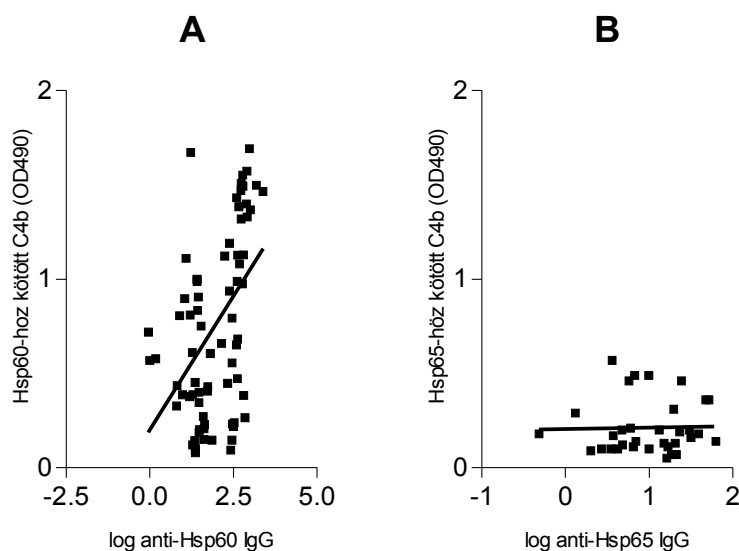
A logisztikus regressziós modell eredménye szerint a humán Hsp60 autoantitestek és HDL koleszterinszintek voltak kapcsolatban a súlyos koszorúér betegséggel, a többi változó kapcsolata nem volt független. A modell lehetőséget adott arra is, hogy kiszámítsuk, mekkora a rizikója egy személynek, ha anti-Hsp60 IgG értéke meghaladja a 200 U/ml értéket (az egészséges véradoókban mért 90-es percentilis). Az esély-hányados 6,01 volt (95%-os megbízhatósági intervallum 1,59-22,7). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az anti-Hsp60

autoantitestek szintje független, szignifikáns jelzője a súlyos koronária betegségnek. Fontos hangsúlyozni, hogy az anti-humán Hsp60 IgG-szint az anti-bakteriális Hsp65 szintektől is függetlenül jelezte a betegséget. Ezt a megfigyelést a korrelációs számítás eredményei is alátámasztották: míg az egyes bakteriális Hsp65 antitestek (anti-Hsp65 és anti-GroEL) között erős (korrelációs együttható értéke 0,46 és 0,61 között) korrelációt találtunk minden csoportban, addig a humán Hsp60 IgG és a bakteriális Hsp antitestek között szignifikáns, de gyenge (r 0,19 és 0,28 között) összefüggés mutatkozott (I. cikk, 5. táblázat). A *Helicobacter pylori* IgG-vel is vizsgáltuk a Hsp antitestek összefüggését: a bakteriális Hsp65 antitestek szignifikáns korrelációt mutattak a HP IgG-vel, azonban a humán Hsp60 autoantitestek esetében ilyen összefüggés nem volt kimutatható. A by-pass műtéten átesett betegek közül 158 esetében nemcsak 6 hónapos, hanem 1 éves vizitre is lehetőségünk volt, ezektől a betegektől két vérmintával rendelkezünk. A Hsp60 autoantitestek mindkét mintában történt mérésének eredménye azt mutatta, hogy az antitestek szintje stabil, a követés ideje alatt szignifikáns változás nem következett be a vizsgálat betegeiben (I. cikk, 1. ábra).

Az anti-M. bovis Hsp65 és anti-humán Hsp60 autoantitestek közötti különbségek elemzése

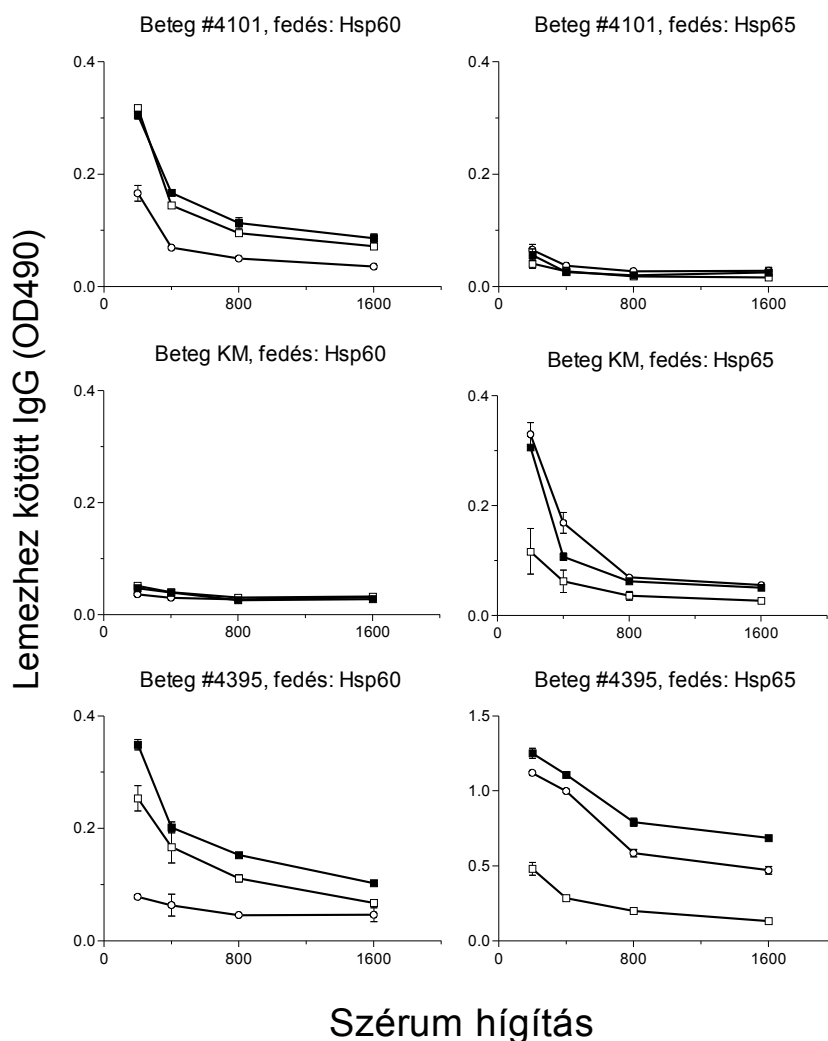
Az előző fejezet eredményei megerősítették, hogy a Hsp60 elleni antitestek emelkedett szintje mutatható ki koronária betegségben. Az irodalomban elsőként általunk elvégzett bakteriális és humán Hsp60 antigénnel reagáló antitestek összehasonlító vizsgálata azonban érdekes, további munkahipotézisünket megalapozó megfigyelést eredményezett. Az eredeti hipotézis (Wick 1995) ugyanis azt feltételezte, hogy a Hsp60 autoantitestek ún. keresztreakáló antitestek, melyek az élet során elszenvedett infekciók ellen védő immunválasz nyomaként maradnak vissza. A bakteriális és humán Hsp60 ellenes antitestek közötti gyenge korreláció és a Hsp60 autoantitestek *H. pylori* fertőzéstől független előfordulása arra készítette bennünket, hogy alaposabb elemzésnek vessük alá ezeket az antigéneket és antitesteket. A bakteriális és humán Hsp60 elleni antitestek közötti különbségek magyarázatát a kétféle csoport közötti strukturális és funkcionális különbségek adhatják. További vizsgálatainkhoz ezért két módszert választottunk. Egyfelől azt vizsgáltuk, hogy aktiválja-e a Hsp60 a humán komplementrendszert, és mutatkozik-e különbség a Hsp60 és a Hsp65 komplementaktiváló képességében. Másrészt megvizsgáltuk, hogy gátlásos kísérletekben kimutathatók-e különbségek – a nagyfokú szekvencia azonosság ellenére – a két molekula epitóp struktúrájában. A vizsgálatok részletes leírása, az alkalmazott metodikák a mellékelt II. cikkében találhatók. Eredményeink szerint a Hsp60 képes a humán komplementrendszert a klasszikus reakcióúton aktiválni. Az aktiváció beindítói a Hsp60-IgG immunkomplexek,

ugyanis nem tudtunk kimutatni komplementaktivációt agammaglobulinémiás szérummintában, és a komplementaktiváció (C4b kötődés) mértéke igen erős összefüggést mutatott az anti-Hsp60 IgG mennyiségével (3. [ábra](#)). Ezzel szemben a *M. bovis* Hsp65 csak gyenge komplementaktivátornak bizonyult, és az anti-Hsp65 IgG antitestek nem mutattak szoros összefüggést a komplementaktiváció mértékével.



3. ábra: A hő sokkfehérjék indukálta komplementaktiváció (Hsp60 [A] és Hsp65 [B] fehérjékhez kötődő komplement C4b mennyisége) és a specifikus IgG antitestek szintje közötti összefüggés (erősen szignifikáns a Hsp60 ($r=0,459$; $p<0,0001$), míg nem szignifikáns a Hsp65 esetében).

Vizsgálati csoportunkból kiválasztottuk 10 beteg mintáját, és ún. kereszt-gátlásos kísérletben elemeztük az antitestek által felismert epitópok sajátosságait (4. [ábra](#)). Kísérletünk eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Hsp60 és a Hsp65 B-sejt epitóp struktúrája csaknem azonos. Igen lényeges azonban, hogy léteznek csak egyik vagy csak másik molekulára jellemző, „specifikus” epitópok is, amit a 4. ábrán bemutatott első két beteg szérumai bizonyítanak.



4. ábra: Anti-Hsp60 és anti-Hsp65 IgG antitestek specificitásának vizsgálata gátlásos ELISA kísérletekben. Az ELISA lemezeket Hsp60-nal (bal oldali ábrák) vagy Hsp65-tel (jobb oldali ábrák) fedtük, majd a betegek szérumainak továbbfutó hígítási soraival inkubáltuk. Az ábrán a lemezhez kötődött specifikus IgG mennyisége van feltüntetve (■-). Az antitestek kötődését a szérum előkezelésével (5 µg/ml Hsp60 [-○-] vagy Hsp65 [-□-]) gátoltuk. A feltüntetett értékek három párhuzamos átlagai±SEM.

A kereszt-gátlásos kísérletekben sikerült olyan anti-Hsp60 autoantitestek létezését bebizonyítani, melyek kötődését csak a Hsp60 gátolja, a Hsp65 nem. Valamint fordítva, olyan anti-Hsp65 antitesteket is ki tudtunk mutatni, melyek kötődését csak a Hsp65 gátolja, a Hsp60 pedig nem. Ez a kísérlet új megvilágításba helyezi azt a korábban általános nézetet, miszerint a humán Hsp60 elleni antitestek a bakteriális homológ Hsp65 fehérjék ellen keletkeznek, és a Hsp60-at keresztreakció útján ismerik fel. Ezt a momentumot eredeti kérdésfelvetésünk (az anti-Hsp60 autoantitestek szerepe atherosclerosisban) lényegesnek tartottuk, így további kísérleteket terveztünk a „specifikus” epitópok pontos jellemzésére.

Az anti-Hsp60 antitestek epitóp specificitásának vizsgálata

A humán és a *M. bovis* Hsp60 molekulák lineáris B-sejt epitópjainak összehasonlító térképezését átfedő peptidsorozatok segítségével végeztük el. A módszerek és az eredmények egy részének részletes leírása a mellékletben található (III. cikk). A két fehérje ismert aminosav sorrendjének megfelelően számítógépes modellezés segítségével elvégeztük a várhatóan B-sejt epitópként viselkedő szakaszok predikcióját. Ezeket a szakaszokat bétakanyar struktúra és alacsony hidrofobicitás jellemzi. A kiválasztott szakaszok szintetizálása polietilén tűhegyen zajló szilárdfázisú peptidszintézissel történt, melynek során Fmoc/*t*Bu eljárást alkalmaztunk. 10-es hosszúságú, 5 aminosavval átfedő peptideket készítettünk el két blokkon (2x96 tűske), ami a kontrollok levonása után 46-46 iker peptid párt jelent a Hsp60 és Hsp65 szekvenciájának megfelelően. A peptideket duplikátumként készítettük el, és mindig a két érték átlagával számoltunk. A peptidek elhelyezését a blokkokon (esetleges szisztematikus hibát elkerülendő) úgy terveztük, hogy egymás mellé az „ikerpárok” kerültek. A Hsp60 és a Hsp65 összesen 10-10 szakaszát fedtük le az átfedő peptidekkel. Tekintettel arra, hogy a peptidek kovalens kötással kapcsolódnak a polietilén tűskékhez, azok ismételt használatára van lehetőség regenerálást követően. A szérum antitestek mérésének pontos leírása szintén a melléklet III. cikkében található. 12 kontroll személy (életkoruk 54,8 év, SD 2,9, 4 nő) és 14 súlyos koronária beteg (életkoruk 58,5 év, SD 7,3, 3 nő) mintáját vizsgáltuk meg a peptidsorozatok segítségével. A III. cikk az egészséges személyek (és az intravénás immunglobulin [IVIG] preparátum) eredményeit összesítve mutatja be. Az 5. ábra (ld következő oldal)¹ összehasonlításra alkalmas módon, részletesen taglalja az egészségesek és a koronária betegek eredményeit. Az ábrán az egyre sötétebb színű mezők jelölik azokat a

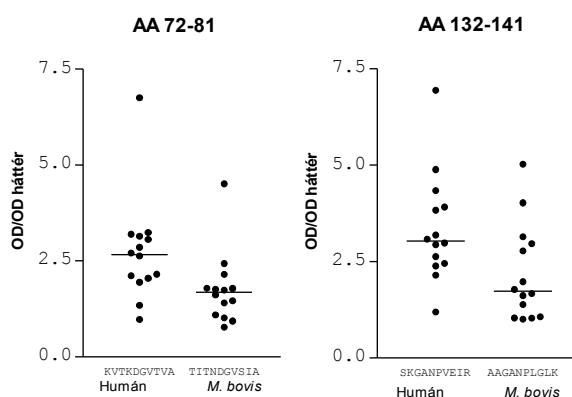
¹ **5. ábra** (az ábrát ld. következő oldalon): Egészséges kontrollok és súlyos koronária betegek anti-Hsp60 és anti-Hsp65 szérum IgG antitestjeinek B-sejt epitóp térképezése. Az ábra felső részén a kontrollok (**A** és **C**) és a betegek (**B** és **D**) antitestjeinek a 46 Hsp60 ill. a 46 Hsp65 peptiddel mutatott reaktivitása van feltüntetve színskálán. A reaktivitást a következő módon számítottuk: a vizsgált peptid OD-ja osztva a legkisebb átlagos (háttér) reaktivitást mutató peptid OD-jával (a normalizálásra használt peptidek fehér vonalként jelennek meg az ábrán). Minden oszlop egy embert jelent, míg a sorokat az egymással átfedő peptidek jelölik. Mind a 4 panel esetében (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért) külön-külön vannak csoportosítva a vizsgált személyek klaszteranalízis segítségével. A kapcsoltság mértékét az LD (linkage distance) jelöli. Az ábra alsó részén az egyes epitópok reaktivitásának egymással mutatott korrelációja van feltüntetve. A színskálázás a korrelációs együtthatók értékének megfelelően történt, az $r > 0,5$ (és $r < -0,5$) minden esetben igen erős, szignifikáns összefüggés volt ($p < 0,0001$), míg az $0,4 < r < 0,5$ (és $-0,4 < r < -0,5$) esetekben mérsékelt ($0,01 < p < 0,05$) összefüggés mutatkozott. A korrelációs számítás a kontrollok (**E** és **G**) és betegek (**F** és **H**) esetében külön-külön történt. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért klaszteranalízissel csoportosítva vannak a hasonló viselkedésű epitópok. A 12 antitest-reaktivitást mutató régió (epitóp) legerősebben reagáló peptidje került kiválasztásra a korrelációs számításához (ezek az 1., 9., 12., 18., 23., 26., 28., 31., 34., 37., 42., 45. peptidek voltak). A korrelációs számítás a „nyers” OD/OD háttér értékekkel történt, és olyan esetben is adhat erősen szignifikáns összefüggést, ha egy adott epitóphoz csak háttér körüli (1-1,5) reaktivitások tartoznak. Az ábra a melléklet végén is megtalálható.

F5

fehérje szakaszokat, melyek ellen antitestek fordulnak elő a vizsgált személyekben. A 10 összefüggő szakaszt lefedő peptidek legalább 12 olyan régiót tartalmaznak, melyeket epitópoknak tekinthetünk. Ezeket az epitópokat arab számokkal jelöltük (1-12-ig), az aminosav számozás feltüntetése előtt. Általában elmondható, hogy a Hsp65 peptidekkel erősebb reakciót mutatnak a szérumminták, mint a Hsp60-nal (ez igaz a teljes fehérjével végzett mérésre is). A kontroll minták esetében (a III. cikkben leírtaknak megfelelően) az epitópok többségét keresztreagáló jellegűnek találtuk, azaz a Hsp65 peptidek és a homológ Hsp60 peptidek ellen is tartalmaznak a szérumok antitesteket (1, 2, 3, 4, 8, 9). Van négy olyan epitóp (5, 6, 11, 12), melyet az egészséges szérumok szinte csak a Hsp65 peptideken ismernek fel, a Hsp60-on nem, ezeket „Hsp65 specifikus” epitópoknak tekinthetjük. Egészségesekben a 7-es és 10-es epitópok ellen nem mutathatók ki antitestek lényeges mennyiségben. Az ábra alsó részén az E és G panelek mutatják egészségesekben az egyes epitópokkal kapott reaktivitások korrelációit egymással. A piros és sötétnarancs színek jelölik a szignifikáns pozitív korrelációt, míg a sötétkék a szignifikáns negatívot. Az epitópok sorrendjének elrendezése, vagyis a hasonlóan viselkedő csoportok kialakítása klaszteranalízis segítségével történt. Az egyes klasztereknek megfelelő epitópok számai téglalappal vannak körbevéve. A Hsp65 epitópok esetében két jól elkülönülő blokkot figyelhetünk meg (G panel). Az egyik a 9, 3, 2 epitópokból áll (ide tartozna még a 7-es is, de ellene igen csekély szintű a kimutatható antitest), melyek erős összefüggésben állnak még az 1, 4, 8-as epitópokkal. A másik blokk az 5, 6, 11, 12-es epitópokból áll (ide tartozna még korreláció alapján a 10-es is, de ellene igen csekély szintű a kimutatható antitest egészségesekben). A két blokk között szinte nincs kimutatható kapcsolat a korrelációs számítás alapján (kivétel a 4-es epitóp). Érdekes, hogy az első blokkban található a keresztreagáló, míg a másodikban a „Hsp65 specifikus” epitópok. A Hsp60 epitópoknál nem figyelhető meg blokkok kialakulása a kontrollok esetében, az 5, 6, 10, 11, 12-es epitópok ellen igen alacsony az antitestek szintje és az 1, 2, 3, 8, 9-es epitópok sem mutatnak egymással szoros kapcsolatot (E panel).

Ez a helyzet azonban megváltozik a súlyos koronária betegek mintái esetében. A betegek szérumainak reaktivitása a Hsp65 peptideken még kifejezettebb (D panel), és az egyes epitópok közötti összefüggés is erősebbé válik (H panel). Jobban elkülönülnek a G panelen látható blokkok, a keresztreagáló blokkba kerül a 7-es és a 8-as epitóp (az 1, 2, 3, 9-es mellé) és a „Hsp65 specifikus” blokkba a 4-es és a 10-es (az 5, 6, 11, 12-es mellé). A két blokk tagjai között csak gyenge kapcsolat mutatható ki (2, 7, 8-as és 6, 11-es között). Ezzel szemben a Hsp60 epitópok esetén a betegek szérumainak erősödik a reaktivitása a 6-os és 10-es epitópokkal szemben, és ezek az epitópok betagozódnak az 5-ös és 12-es mellé, melyekkel

közösen egy blokkot alakítanak ki (F panel). Ez a blokk viszont jelentős összefüggést mutat az 1, 2, 3-as epitópokkal (melyek megerősödését láhattuk a Hsp65 esetén). Más szóval a betegekben jellemzően együtt fordulnak elő ezek az antitestek. Ezt mutatja, hogy a Hsp60 1, 2, 3-as epitópokkal szemben szignifikánsan emelkedett az antitestek szintje a betegekben az egészségesekhez képest ($p=0,0001$, $F=15,52$). Ugyanezek a keresztreagáló antitestek erősen kapcsolódnak a Hsp65 1, 2, 3-as epitójaival is. Ezekkel szoros összefüggésben a Hsp65 5-, 6-, 10-, 11- és 12-es epitópok ellen is fokozott mértékben jelennek meg antitestek a betegekben. A keresztreagáló antitestek túlnyomó többségben vannak az egészségesekben és a betegekben is azon antitestekhez képest, melyek erősebben („specifikusan”) reagálnak az iker peptidek humán megfelelőjével. Két olyan epitópot jellemeztünk az egészségesek mintáiban korábban, melyek erősebben ismerik fel a humán epitópokat, mint a bakteriálisat (az 1-es és 2-es epitópok egy-egy részét (AA67-81 és 132-141 a Hsp60 molekulán, III.). Megvizsgáltuk a két szakasz (és bakteriális homológjaik) ellen az antitestek szintjét koronária betegekben is (6. ábra).



6. ábra: 14 koronária beteg szérum antitestjeinek reaktivitása „humán specifikus” Hsp60 és Hsp65 epitópokkal. A bal oldali panelen az 1-es epitópra, míg a jobb oldalon a 2-es epitópra lokalizálódó peptid adatai láthatók ($p=0,0134$ ill. $0,0017$). Az adatok az 5. ábrán bemutatott eredmények részét képezik. Az antitestek kimutatása a tűhegyekhez kötött peptidek segítségével történt.

Eredményeink azt mutatják, hogy hasonlóan az egészségesek mintáihoz, a betegekben is jelen vannak azok az antitestek, melyek a jelzett két régióban a peptidek közül a humán homológokat ismerik fel erősebben. Ezek az antitestek fokozott mértékben jelennek meg a betegekben. A két régió része egy-egy nagyobb szakasznak, melyeken a fehérjék N-terminálisa felé elhelyezkedően keresztreagáló epitópokat találtunk.

Az epitóp térképezéshez felhasznált 12 kontroll és 14 beteg mintájában megmértük a teljes anti-Hsp60 IgG és anti-Hsp65 IgG mennyiséget is, az I. cikkben leírt ELISA módszerrel.

A 7. ábra² mutatja be, hogy az egyes epitópok esetében mért reaktivitások, és a teljes fehérje esetén kapott AU/ml értékek milyen összefüggést (korreláció) mutatnak.

Lényeges különbségek figyelhetők meg az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitestek epitóp reaktivitásokkal mutatott korrelációs tulajdonságaiban. Egészségesekben az anti-Hsp60 autoantitestek csaknem minden epitóp régió valamely peptidjével mutatnak gyenge, pozitív összefüggést. Sok esetben azonban nem tapasztalható összefüggés ott, ahol egyébként kimutatható epitóp-specifikus antitest van (pl. 1-es epitóp első fele, 3-as, 4-es, 9-es epitóp, 5. ábra 26. oldal). A betegekben ez a kép teljesen megváltozik, az 1-es, 2-es, 8-as és 9-es epitópoknak megfelelően negatív korrelációt észlelhetünk, míg gyenge pozitív összefüggés jelenik meg a 4-es, 5-ös és 12-es epitópok területén.

A Hsp65 epitópok és az anti-Hsp65 IgG összefüggésében teljesen eltérő kép ábrázolódik. Egészségesekben a korábbiakban keresztreakálónak jellemzett 1, 2, 3, 7, 8, 9-es epitópok elleni antitestek és a teljes anti-Hsp65 között mutatható ki korreláció. Ezek az epitópok kivétel nélkül külső lokalizációban helyezkednek el a tetradecamer molekula térbeli modelljén. A koronária betegekben ezzel szemben a 4, 5, 6, 10, 11, 12-es epitópokkal reagáló antitestek és az anti-Hsp65 IgG között mutatkozik pozitív összefüggés. Ezek az epitópok főleg a korábban „bakteriális Hsp specifikus” epitópokat tartalmazó blokkhoz tartoztak. Ezek az epitópok (egy kivétellel, 11) a tetradecamer molekula belső, a foldingban közvetlenül szerepet játszó üregének felszínén helyezkednek el.

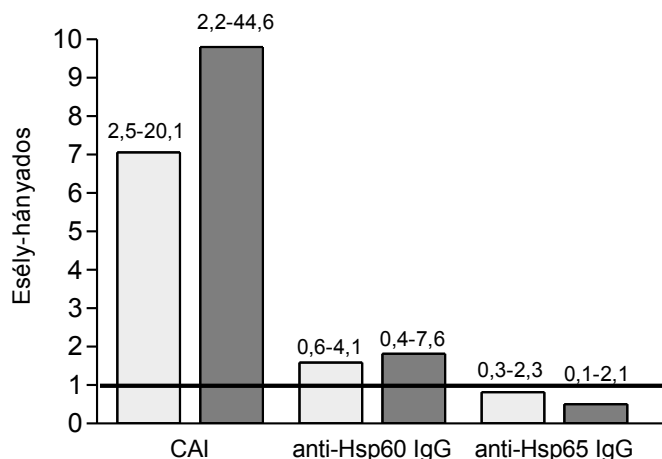
² **7. ábra** (ld. következő oldalon, az ábra a melléklet végén is megtalálható): Az anti-Hsp60 IgG és anti-Hsp65 IgG antitestek korrelációja az egyes epitóp régiókkal reagáló antitestekkel egészségesekben (n=12) és koronária betegekben (n=14). Az egymás melletti táblázatok a Hsp60 (**A**) és a Hsp65 (**B**) szekvenciájának megfelelően szintetizált peptidok adatait mutatják. A peptidok mellett baloldalon az egészségesek (eg), jobb oldalon az ischaemiás szívbeteg (ISZB) mintáinak eredményei vannak feltüntetve színezéssel jelölt skálán. A táblázatok mellett feltüntetésre került, hogy az adott epitóp szakasz a teljes molekula térbeli modelljén hol helyezkedik el (v.ö. a melléklet III. cikkének 1. ábrájával).

F7

A komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek jellemzése

A korábbiakban ismertetésre került (II. cikk, 23. oldal), hogy lényeges funkcionális különbségeket is tapasztaltunk az anti-Hsp60 autoantitestek és az anti-Hsp65 antitestek között. Koronária betegségben szenvedőkben a magas titerű anti-Hsp60 autoantitestek komplementaktiválónak bizonyultak, míg ezt az anti-Hsp65 antitestek esetében nem észleltük. Ez a megfigyelésünk a technológia akkori állása szerint új volt, ezért szabadalmi bejelentést tehettünk. Az általunk kidolgozott eljárás alapján a skóciai Omega Diagnostics Ltd. cég AtheroRisk néven diagnosztikus Kit-et fejlesztett a komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek mérésére.

A komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek klinikai értékét olyan gyermekek mintáival vizsgáltuk, akiknek egy vagy több közvetlen felmenője korán (<55 év) szenvedett el myocardialis infarctust. A gyermekek a Semmelweis Egyetem II. Gyermekgyógyászati Klinikájának (Dr. Szamosi Tamás) szervezésében megvalósított szűrőprogramban vettek részt, melynek során az iskolai védőnők a 7. osztályos tanulók között végeztek kérdőíves felmérést. A kiemelt gyermekek komplex kardiovaszkuláris rizikóstátusz felmérésen vettek részt, és életmód- valamint diétás tanácsadásban részesültek. Összesen 32 – magas családi rizikóval jellemezhető – gyermektől állt rendelkezésünkre szérumminta, melyekben a IV. cikkben leírtak szerint elvégeztük az anti-Hsp60 autoantitest vizsgálatokat. Ennek során párhuzamosan mértük meg a komplementaktiváló (CA) anti-Hsp60 autoantitesteket (mennyiségüket a komplementaktivációs index-szel [CAI] fejeztük ki) és az IgG anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitesteket. Analízisünk kiterjedt a rögzített és mért további paraméterekre is (IV. cikk, 2. táblázat). Kontroll csoportként a II. Gyermekgyógyászati Klinikán tervezett műtét (legtöbbször sérv vagy mandula műtét) miatt hospitalizált gyermekek szolgáltak. A magas családi rizikójú gyermekek mintáiban lényegesen kedvezőtlenebb (atherogén) lipid profil mellett szignifikánsan emelkedett CA anti-Hsp60 autoantitestszintet találtunk. Tekintettel arra, hogy a két csoport között több paraméter vonatkozásában is lényeges eltérés mutatkozott, logisztikus regressziót alkalmaztunk annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a CA anti-Hsp60 független jelzője-e a megnövekedett családi kardiovaszkuláris rizikónak. A vizsgált és kontroll gyermekeket az antitestszinteknek megfelelően kvartilisekre bontottuk, kategorizáltuk, és a legalacsonyabb kategóriát hasonlítottuk a legmagasabbhoz. A 8. ábrán feltüntetett eredményekből látszik, hogy csak a CA anti-Hsp60 esetében tapasztaltunk szignifikáns összefüggést a családi rizikó és az antitestszintek között.



8. ábra: A koronária betegség családi rizikója és a különféle anti-Hsp antitestek közötti kapcsolat (többszörös logisztikus regressziós analízis nem illesztett (világosszürke) és illesztett (sötétszürke; figyelembe vett változók: életkor, HDL-koleszterin, LDL-koleszterin, fehérvérsejt-szám, szülők dohányzási szokása) formája, melynek során a legalacsonyabb (alsó kvartilis) antitestszintet mutató gyerekekhez hasonlítottuk a legmagasabb (legfelső kvartilis) szintet mutató gyerekeket). Az oszlopok fölé írt értékek a 95%-os megbízhatósági intervallumot jelölik. CAI: komplementaktivációs index

Azoknak a gyermekeknek, akiknek a CA indexe >2 , kb. 7-szer nagyobb az esélye, hogy nagy rizikójú csoportba tartozzanak, mint a $<0,6$ indexű gyerekeknek. Az összes változóra illesztett analízis eredménye azt mutatja, hogy a CA anti-Hsp60 autoantitestek a lipid paraméterektől és gyulladásos markerektől függetlenül képesek jelezni a megnövekedett családi rizikót. Az össz-IgG anti-Hsp60 mérések nem mutattak hasonló összefüggést, melyből arra következtethetünk, hogy a funkcionális (komplementaktivációt mérő) teszt ebben az összefüggésben felülmúlja az össz-IgG mérés eredményét. Ebben a betegcsoportban a kedvezőtlen (alacsony HDL-, magas LDL-koleszterin) lipid profil is független jelzője volt a fokozott családi rizikónak, ami a klasszikus rizikófaktorok és életmód/táplálkozási tényezők szerepét hangsúlyozza.

Az anti-Hsp60 autoantitestek vizsgálata HIV-fertőzöttekben és szisztémás autoimmun kórképekben szenvedőkben

Az anti-Hsp60 autoantitestek viselkedésének alaposabb megismerése céljából két további betegséget, a HIV-fertőzést és különféle szisztémás autoimmun betegségeket is vizsgáltunk. Ezeknél az egyik közös jellegzetesség a poliklonális B-sejt aktiváció jelenléte. A betegcsoportok leírását és az alkalmazott mérési eljárásokat a melléklet V-ös és VI-os cikkei mutatják be részletesen. Eredményeink szerint sem a HIV-fertőzöttekben, sem szisztémás autoimmun megbetegedésekben szenvedőkben (kivételek a kevert kötőszöveti betegség, ahol a *Helicobacter pylori* infekcióval szoros kapcsolatban emelkedett anti-Hsp60

autoantitest szinteket találtunk, ld. később) nem emelkedik az anti-Hsp60 autoantitestek koncentrációja (V. cikk, 1. ábra, VI. cikk, 1. ábra). Ugyanakkor HIV-betegekben azt tapasztaltuk, hogy a betegség előrehaladtával nem emelkedik, hanem csökken az antitestek szintje. Ismert, hogy HIV-betegség progresszióját a B-sejtek aktivációja és poliklonális felszaporodása kíséri, emelkedett szérum össz IgG-szintekkel (De Milto, 2004). Hasonló tapasztalatot szereztünk az SLE-s betegcsoportban is. Az SLE-s betegek 80%-ában emelkedett (>1180 mg/dl) IgG koncentrációt mértünk (a csoport mediánja 1603 mg/dl volt, interkvartilis tartomány 1285-1928). Az emelkedett IgG-szintek nem jártak együtt a specifikus anti-Hsp60 autoantitestek felszaporodásával. Érdekes további megfigyelésünk volt, hogy az SLE-ben patogenetikai szereppel bíró anti-C1q autoantitestek szintje erős összefüggést mutatott az anti-Hsp60 autoantitestekkel (VI. cikk 2. táblázat és 2, 3-as ábrák). Ezt az összefüggést a későbbiekben HIV-betegekben is észleltük (VII. cikk, 2. ábra) és epitóp analízissel is tanulmányoztuk (VII. cikk, 4. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy kecskében termeltetett anti-C1q poliklonális antitestek felismerik a humán Hsp60 és az *M. bovis* Hsp65 fehérjét. A fehérjéken 3 epitópot is azonosítani tudtunk, melyek felelősek lehetnek a keresztreakcióért. Az 5. ábrán is alkalmazott számozás szerint ezek a 6, 7, és 11-es epitópok, melyek közös jellemzője, hogy Hsp65 specifikusak.

Megbeszélés és a további munkahipotézis kifejtése

Az atherosclerosis patogenezisének tanulmányozásához a koronária betegséget választottuk modellnek. Az Országos Kardiológiai Intézet munkatársaival közösen másfél év alatt több, mint 400 beteget vontunk be vizsgálatunkba, melyet úgy terveztünk, hogy a tárolt minták alkalmasak legyenek immunológiai, infektológiai és genetikai mérések kivitelezésére. Első célunk a 60 kDa-os hősokkfehérjék elleni autoimmunitás vizsgálata volt, és terveztük, hogy a továbbiakban ezt a kérdést komplex összefüggéseiben is vizsgáljuk.

A 60 kDa-os hősokkfehérjék elleni antitestek szerepe az atherosclerosis patogenezisében

Az anti-Hsp60 autoimmun mechanizmus atherosclerosis patogenezisében játszott szerepének vizsgálatát Georg Wick és munkatársai megfigyelése nyomán kezdtük meg. Fent bemutatott eredményeink megerősítik és kiterjesztik eredeti hipotézisüket, ugyanis koronária betegségben is sikerült kimutatnunk az anti-Hsp60 autoantitestek független kapcsolatát a betegséggel. Első vizsgálatunk kivitelezése alatt és azt követően keletkezett további saját és irodalmi eredmények is alátámasztják az eredeti hipotézist (4. táblázat).

4. táblázat: Klinikai összefüggések atheroscleroticus érbetegségek és 60 kDa-os hőszokkfehérje antitestek között

Betegség/tünet	Eset/kontroll	Antitest	Összefüggés	Hivatkozás	Megjegyzés
ISZB (AMI)	203/76	Hsp65 IgG/A/M	Igen	Hoppichler, 1996	Az antitestek szintje csökken az esemény után
ISZB (AMI)	34/260	Hsp65 IgG Hsp60 IgG	Igen Nem	VIII.	Az antitestek szintje csökken az esemény után
ISZB (PTCA)	28/12	Hsp65 IgG	Igen	Mukherjee, 1996	
ISZB (angio)	136	Hsp65 IgG	Igen	Birnie, 1998	
ISZB (angio)	274/91	Hsp60 IgG	Igen	Zhu, 2001	
ISZB (CABG)	357/321	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Igen	I.	
ISZB (magas rizikó)	386/386	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Nem	IX.	Prospektív vizsgálat
ISZB (magas rizikó)	239/239	Hsp60 IgG Hsp60 IgA cHsp60 IgG cHsp60 IgA	Igen Nem Nem Nem	Huittinen, 2002	Prospektív vizsgálat
ISZB (familiaris prediszpozíció)	32/63	CA Hsp60 Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Igen Nem	IV.	
ISZB (angio)	250/250	Hsp60 IgG cHsp60 IgG	Igen Nem	Mahdi, 2002	
ISZB (angio)	270/98	Hsp60 IgG	Igen	Bason, 2003	
ISZB (SAP)	43/46	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Nem	Heltai, 2003	
AS (EBCT)	201	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Nem	Zhu, 2004	
AS (IMT)	867	Hsp65 IgG/A/M	Igen	Xu, 1993b és 1999	Prospektív vizsgálat
AS (IMT)	141	Hsp65 IgG/A/M	Igen	Knoflach, 2004	
Stroke	180/64	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Igen	Gromadzka, 2001	
Stroke	93/93	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Igen Igen	Staub, 2003	
Stroke	292/485	Hsp60 IgG Hsp65 IgG	Nem Nem	X.	

ISZB: ischaemiás szívbetegség, AMI: akut myocardialis infarktus, PTCA: perkután transluminális koronária angioplasztika, CABG: koronária-aorta by-pass graft, SAP: stabil angina pectoris, EBCT: electron-beam computed tomography imaging, IMT: intima-media thickness, angio: angiográfiás diagnózis

Az anti-*M. bovis* Hsp65 antitestek vonatkozásában koronária betegekben kapott eredményeink teljesen megfelelnek a Xu és mtsai (1993b és 1999, carotis atherosclerosis) valamint Hoppichler (1996, koronária betegség), Mukherjee (1996 koronária betegség) és Birnie (1998, koronária betegség) közléseinek. Az innsbrucki munkacsoport hipotézise mycobacteriális Hsp65 fehérjével kapott eredményeken alapul. Eredetileg nyúlban termeltetett „immun” antitesteket vizsgáltak, és ezek hatásait elemezték tovább *in vitro* sejtkultúrákon. Az így kapott eredményeket klinikai vizsgálatban is megerősítve látták (Bruneck vizsgálat), amikor Hsp65 ellen emelkedett mértékben mutattak ki antitesteket carotis atherosclerosis fennállása esetén (Xu, 1993b). A legmagasabb antitestszinteket azokban találták, akikben nőtt a carotis plakkok nagysága az 5 éves követés alatt. A Hsp65-tel végzett antitest meghatározások alapvetően a humán homológgal keresztreagáló antitestek vonatkozásában informatívek. Wick és munkatársai is azt a konklúziót vonták le az irodalmi ismeretek alapján, hogy a keresztreagáló anti-Hsp60 autoantitestek fontos jelzői az atheroscleroticus érbetegségeknek (Wick, 2004). Azonban mint ők is rámutatnak (és saját

vizsgálataink [VIII, IX, X] is erre utalnak) nem alakult ki ilyen egységes kép a humán Hsp60-nal végzett autoantitest meghatározások területén. Ennek több oka is lehet. Egyrészt a humán Hsp60-nal végzett autoantitest mérés feltehetően nem annyira robusztus, mint a keresztreakáló antitestek mérése, melynek oka az antitestek alacsonyabb affinitása és fokozott diverzitása lehet. Nem egységesek továbbá a vizsgálatok a bevont személyek tekintetében, ez vonatkozik az életkorra, a betegség definíciójára, a kórtörténetre és a rizikófaktorok jelenlétére. Vannak vizsgálatok, melyek szerint a koronária betegség súlyosságával is pozitív összefüggést mutatnak ezek az antitestek (Zhu, 2001). Állatkísérletes és humán vizsgálatok is azt mutatják, hogy akut myocardialis infarktust követően csökken az anti-Hsp antitestek szintje, így azokban, akik több infarktust is átéltek már, alacsonyabb titerek várhatók, mint infarktust át nem élt személyekben (Hoppichler, 1996, Schett, 1999, VIII.). Saját eredményeink, melyeket a HOPE vizsgálatba bevont személyek mintáival kaptunk, feltehetően emiatt adtak negatív eredményt a Hsp60 autoantitestek vonatkozásában (IX.). Ebbe a vizsgálatba idősebb, halmozott rizikóstátusszal rendelkező koronária betegek kerültek bevonásra, és több, mint 50%-uk szenvedett el korábban myocardialis infarktust. A saját beteganyagunk (I.) és a HOPE vizsgálat populációja közötti különbségre utal az is, hogy a HOPE vizsgálatban, az infektológiai markerek közül (*Chlamydia* IgG és IgA, *H. pylori* IgG, hepatitis A vírus IgG) csak a cytomegalovírus IgG szerostátusz volt jelzője az eseményeknek (Smieja, 2003). Saját vizsgálatunkban ezzel szemben a cytomegalovírus IgG nem, viszont a *Chlamydia* IgG (a Hsp60 autoantitestekkel egymást erősítő módon) összefüggést mutatott a koronária betegséggel (részletesen ld. alább). Ezenkívül a dohányzás is emelkedett anti-Hsp antitestszintekkel járhat. Mindezek a tényezők együttesen okozhatják az irodalomban koronária betegség vonatkozásában jelenleg tapasztalható ellentmondásokat.

A carotis atherosclerosis és stroke vonatkozásában is vannak ellentmondások a vizsgálatok között. Xu és munkatársai eredeti megfigyeléseivel összhangban (1993b és 1999) mi is azt találtuk, hogy a carotis atherosclerosis az életkorral fokozódik, és ezt a folyamatot az anti-Hsp65 antitest titerek növekedése kíséri (X). A mi vizsgálatunkban azonban stroke-on átesett betegek szerepeltek, akikben nem találtunk összességében emelkedett anti-Hsp antitest mennyiségeket az egészséges kontrollokhoz képest. Ennek oka (az akut myocardialis infarktushoz hasonlóan) lehet az, hogy a szöveti elhalással jellemezhető infarktusos folyamatban az anti-Hsp antitestek immunkomplexet képeznek, kötődnek és fokozott mértékben eliminálódnak. Ugyanakkor az is valószínű, hogy különbségek vannak az agyi érbetegségek és a koszorúér betegségek patofiziológiája között (Füst, 1999), ami magyarázhatja az anti-Hsp vonatkozásában észlelt különbségeket is. Az utóbbi időkben

független vizsgálatokban (Gromadzka, 2001, Staub, 2003) alacsony esetszámok mellett, nem precízen illesztett vizsgálati csoportokban (logisztikus regressziós számítás mellőzve) emelkedettnek észlelték az anti-Hsp60 autoantitestek mennyiségét, ezért mi is újabb betegek bevonásával folytatjuk vizsgálatunkat, hogy azonosíthassuk azokat a tényezőket, amelyek befolyásolhatják az egyes vizsgálatok eredményeit és magyarázhatják az azok között tapasztalt különbségeket.

Az anti-Hsp60 autoantitestek és az anti-M. bovis Hsp65 antitestek összehasonlító vizsgálata

Az irodalomban elsőként végeztük el a bakteriális Hsp65 elleni és az anti-humán Hsp60 autoantitestek összehasonlító elemzését atheroscleroticus érbetegségekben. Ez a stratégia fontos új megfigyelésekhez vezetett el a korábbi vizsgálatok konfirmálása mellett. Klinikai és molekuláris bizonyítékokat is szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy a kétféle antitest csoport között lényeges eltérések vannak. A többszörös logisztikus regressziós analízis eredménye szerint beteganyagunkban csak az anti-humán Hsp60 autoantitestek szintje mutat független kapcsolatot a súlyos koszorúér betegséggel, a bakteriális Hsp-k elleni antitesteké nem. Továbbá a korrelációs számítás eredményei azt is jelzik, hogy a bakteriális Hsp-k elleni antitestek szintjei egymással igen szoros korrelációt mutatnak, míg a humán autoantitestekkel csak igen gyengét. A *Helicobacter pylori* infekciót jelző antitestekkel is csak a bakteriális Hsp antitestek mutattak összefüggést, a humán anti-Hsp autoantitestek nem. Mindezek a különbségek arra sarkalltak bennünket, hogy a kétféle antitest csoport közötti különbségeket alaposabb vizsgálódás tárgyává tegyük. További vizsgálatainkkal sikerült kimutatni, hogy a bakteriális és a humán Hsp60 között azok komplementaktiváló képességében és epitóp struktúrájában is különbség mutatkozik.

A 60 kDa-os hőszokkfehérje B-sejt epitópjainak térképezését különféle klinikai kérdések alapján, eltérő megközelítésekből vizsgálták eddig. Ismertek munkák, melyek a fertőző ágens oldaláról (*Rickettsia*, *Helicobacter*, *Chlamydia*, *Porphyromonas*) közelítik meg a kérdést, ezen munkák célja olyan epitópok azonosítása volt, melyekkel pontosabb, specifikusabb diagnosztika vagy predikció végezhető az adott állapotban (Lachumanan, 1993, Yi, 1993, Maeda, 2000). Más megközelítés indította az adjuváns arthritis és autoimmun diabetes modellekben a Hsp60 B-sejt epitóp térképezést (Ulmansky, 2002, Elias, 1994). Ebben az állapotban a Hsp elleni B- és T-sejtes immunválaszt szabályozó jellegűnek találták, az epitóp térképezés célja azon motívumok felderítése volt, amelyek ellen a betegséggel szemben védő immunválasz kelthető.

Az atherosclerosis vonatkozásában Wick és munkacsoportjának célja a Hsp60 epitóp térképezéssel az volt, hogy azonosításra kerüljenek azok az epitópok, melyek keresztreakció révén a sajátjal reagáló anti-Hsp60 autoantitestek keletkezéséért felelősek lehetnek (Metzler, 1997, Perschinka, 2003).

Saját kutatásunkat ezen a területen az motiválta, hogy az atheroscleroticus érbetegségben szenvedők szérum antitestjeinek vizsgálatakor lényeges különbségeket találtunk az anti-bakteriális és anti-humán Hsp60 autoantitestek között, mely különbségek számunkra bizonytalanná tették az egyszerű „keresztreakciós” elméletet. Ezért összehasonlító B-sejt epitóp térképezést végeztünk el kezdetben egészségesek (több ezer véradó plazmájából kivont immunglobulin készítménnyel [IVIG] és véradók egyedi mintáival, III.) majd koronária betegségben szenvedők mintáival.

Eredményeink arra utalnak, hogy egészségesek szérumaiban található olyan antitestek, melyek erősebb reakciót adnak a Hsp65 szekvenciának megfelelő peptidek esetén (5, 6, 11, 12, ez utóbbi kettő kifejezettebben), mint a humán peptidek esetén. Olyan peptidek is kimutathatók azonban, melyek a humán peptidek esetén mutatnak erősebb kötődést az antitestekkel (1-1 peptid az 1-es és 2-es epitóp régióban, ld. 5. ábra is). Ugyanakkor a keresztreakáló (mindkét fehérjén felismerésre kerülő) epitópok mind számban, mind a reaktivitás erősségében túlsúlyban vannak (1, 2, 3, 4, 8, 9). Kiemelendő, hogy egészségesekben a Hsp65 epitópok között két csoport különíthető el: az egyik csoportba elsősorban a keresztreakáló epitópok tartoznak (2, 3, 9), míg a másik csoportban találjuk a „Hsp65 specifikus” epitópokat (5, 6, 11, 12). Ez azt jelenti, hogy akik egy csoporton belül az egyik epitóp ellen hordoznak antitesteket, azok nagy valószínűséggel a csoporton belül a többi epitóppal szemben is tartalmazzanak antitesteket. A két csoport között azonban csak laza kapcsolat mutatkozik. A két csoport elleni antitestek keletkezéséhez feltehetően más-más kórfolyamatok vezetnek, melyeket ma még nem ismerünk. Hasonló blokkok kialakulása azonban nem mutatható ki a Hsp60 peptidek vonatkozásában az egészségesek mintáinak vizsgálatakor. Ez arra utal, hogy ezekkel az epitópokkal feltehetően polireaktív, egymás szintjével változó, erősebb-gyengébb összefüggést mutató antitestek reagálnak. Ebben az esetben feltehetően csak részben érvényesül, hogy az egyes epitópokkal szemben valamely jól meghatározott egyedi inger (pl. valamely fertőzés) miatt keletkeznek antitestek. Ezt a feltételezést az is megerősíti, hogy a teljes Hsp60 IgG korrelációja sok Hsp60 epitóppal (peptiddel) mutatható ki, azonban ezek az összefüggések inkább gyengébbek (7. ábra). Ez arra utalhat, hogy egészségesekben az anti-Hsp60 autoantitestek valóban alacsony affinitású, polireaktív antitestek.

Súlyos koszorúér betegségben szenvedőkben azonban megváltozik az egyes epitópokkal szemben található antitestek eloszlása. Általában igaz, hogy ugyanazon epitópok ellen találhatók antitestek, azonban ezek mennyisége változik, megnövekszik az 1, 2, és 3-as epitópok (Hsp60) és az 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11-es epitópok (Hsp65) esetében. Ezzel párhuzamosan az egyes epitóp-specifikus antitestek közötti korreláció is megváltozik (5. ábra F és H panelek). A Hsp65 peptidek esetében a Hsp60-nál látott blokkok kialakulása még kifejezettebbé válik, és a két blokk között mérsékelt, következetes összefüggés jelenik meg. Más szavakkal, megnövekszik annak az esélye, hogy mindenki hordozzon minden epitóp ellen antitestet, (*epitóp spreading*). A teljes Hsp65-tel reagáló IgG korrelációja az egyes epitóp-specifikus antitestekkel is érdekes megfigyelést szolgáltatott. Míg egészségesekben korrelációt tapasztaltunk a keresztreakáló epitópok (melyek mind a tetradecamer molekula felszínén helyezkednek el) elleni antitestek és a teljes Hsp65 IgG között, addig a betegek mintáiban a „Hsp65 specifikus” epitópok (melyek a molekula belső, fehérje foldingban érintett felszínén helyezkednek el) elleni antitestekkel mutatkozott az összefüggés (7. ábra). Ez arra utal, hogy a betegekben az epitóp spreading jelenségéért nagy valószínűséggel a Hsp65 fehérje antigénprezentáló sejtek által történő fokozott felvétele, feldolgozása és bemutatása lehet a felelős, melyet „immun” antitestek megjelenése követ. Ez a hatás feltehetően a krónikus infekciók összeadódó hatásának (patogénnel való terheltség) tudható be.

Ugyanakkor a Hsp60 peptidekkel szemben is változik a kép a betegek mintáiban. Itt is jól felismerhetővé válnak a „keresztreakáló” és „Hsp65 specifikus” blokkok, melyek között ebben az esetben is van konzekvens kapcsolat (elsősorban az 1, 2, 3 és az 5, 6, 10-es epitópok között). Ez arra utal, hogy az ischaemiás szívbetegekben bizonyos hatásokra fokozódik az epitópok diverzitása, és az egyes emberek is többféle antitestet hordoznak. Ezek az antitestek jól jellemezhető epitópokon keresztül, valóban keresztreakálnak a saját Hsp60-nal. A további kutatások fontos területe lesz azon tényezők felderítése, melyek az anti-Hsp65 antitestek sokszínűségének növekedéséhez (5, 11, 12-es epitópok), az epitóp spreading-hez vezethetnek. Fontos hangsúlyozni azt is, hogy az a két fehérje szakasz, melyekkel szemben „humán specifikus” antitestek voltak kimutathatók egészségesekben, fontos epitópoknak mutatkoztak a koronária betegekben is. Az 1-es régióban található Hsp60 peptid ellen (AA 72-81) és a 2-es régióban található peptid ellen is (AA 132-141) fokozódott a betegekben kimutatható antitestek mennyisége.

Saját eredményeinket összehasonlítva az irodalomban korábban bemutatott adatokkal megállapítható, hogy igen jó egyezés van az eddig leírt Hsp60 B-sejt epitópok

elhelyezkedésében (5. táblázat és 9. ábra)³. Az általunk bakteriális túlsúlyú („specifikus”) epitópoknak jellemzett régiók közül (5, 6, 11, 12) az összes epitópot leírták valamely fertőzőes betegségben korábban, míg a keresztreakáló epitópok identifikálását célzó vizsgálatban (Perschinka, 2003) egyik „bakteriális specifikus” epitópot sem azonosították. Ugyanebben a vizsgálatban a keresztreaktív epitópként azonosított 8 régió közül 4 a mi vizsgálatunkban is keresztreaktív volt (2-es epitópban két szakasz, és az 5-ös és 10-es epitópok, a maradék 4 szakaszt mi nem szintetizáltuk meg). Ezt kiegészíti az Ulmansky és mtsai (2002) dolgozatában bemutatott 3, az adjuváns arthritisszel szemben védettséget jelentő epitóp elhelyezkedése. A három közül két epitóp is keresztreaktívnek mutatkozott vizsgálatunkban (1, 4-es epitópok), ami erősíti annak a lehetőségét, hogy ezek az antitestek részt vesznek a Hsp60 elleni perifériás tolerancia biztosításában, vagyis a saját antigének védelmében. Saját vizsgálatunk eredményei szerint „humán specifikus” epitópok homológ régiói egyik fertőzőes állapotban sem kerültek felismerésre, ellenük antitest nem volt kimutatható (9. ábra). Ez az összefüggés tovább erősíti azt a hipotézisünket, hogy ezen epitópok ellen valódi autoantitestek mutathatók ki egészségesekben, melyek feltehetően a sajátot védő, természetes autoantitest repertoár részét képezik. Ugyanakkor ezeknek a jól meghatározható epitóp specifikitású autoantitesteknek a szintje koronária betegségben megnövekszik (6. ábra). Ma még nem ismert, hogy ezen autoantitestek milyen gyakorisággal fordulnak elő egyes kórállapotokban, szintjük mely klinikai vagy immunológiai paraméterekkel mutat összefüggést, és hogy szintjük áll-e valamilyen specifikus szabályozás alatt. Ennek a két régiónak a további részletes feltérképezése, és az epitóp-magoknak megfelelően szintetizált peptidokkal végzett tömegvizsgálatok megszervezése munkacsoportunk fontos további feladatait képezik.

Negatív korrelációk a 7. ábrán, ezt nem tudom diszkutálni és magyarázni! Hogy lehet azt magyarázni, hogy minél magasabb az össz IgG a molekula ellen, annál kevesebb egy adott epi ellen? (És ez leginkább a betegek / Hsp60-ra érvényes (1, 2 epi), A panel, jobb oszlop. Mi történik a betegekben, ami átfordítja a korrelációt?)

³ **9. ábra** (ld. oldalon): A Hsp60 B-sejt epitópok elhelyezkedése. Az ábrán 5 species (humán P10809, *Rickettsia tsutsugamushi* P16625 (Rt), *Porphyromonas gingivalis* P42375 (Pg), *Chlamydia trachomatis* P17203 (Ct), *Mycobacterium bovis* P06806) Hsp60-homológ fehérjéjének a Clustal W programmal illesztett összehasonlítása van feltüntetve. Vastag betűvel és aláhúzással a következő munkákban leírt epitópok vannak kiemelve: humán Hsp60 IVIG epitópok (III.); Rt: Kiütéses tifuszban szenvedők mintáival végzett epitópanalízis (Lachumanan, 1993); Pg: Periodontitisben szenvedők mintáival végzett epitópanalízis (Maeda, 2000), *C. trachomatis*-al fertőzött nyulak mintáival végzett epitópanalízis (Yi, 1993); *M. bovis*: Koronária betegségben szenvedők mintáival végzett epitópanalízis (jelen dolgozat, 5. ábra). Fekete kiemeléssel a Perschinka és mtsai (2003) dolgozatában leírt epitópok, zöld kiemeléssel az Ulmansky és mtsai (2002) által jellemzett, adjuváns arthritisszel szemben védő epitópok vannak jelölve (egy esetben [5. epitóp] a zöld és fekete kiemelés egybeesik). A sorok fölül írt 1-12 számozás a szövegben is használt, saját munkánkban leírt epitópok elhelyezkedését mutatja. A szürke kiemelés a szntézisre kiválasztott szakaszokat jelöli.

5. táblázat: A Hsp60 B-sejt epitópok térképezése során nyert saját eredményeink összehasonlítása az irodalmi adatokkal*

Epitóp régió*	Szekvencia hasonlóság ismert autoantigénnel/ autoimmun betegség (Jones, 1993)	Carotis atherosclerosis, Hsp65 (Metzler, 1997)	Carotis atherosclerosis, Hsp60, Hsp65 (Perschinka, 2003)	Adjuváns arthritis (patkány), Hsp65 (Ulmansky, 2002)**	Kiütéses tifusz <i>Rickettsia tsutsugamushi</i> Sta58 (Lachumanan, 1993)	Periodontitis- <i>Porphyromonas gingivalis</i> GroEL (Maeda, 2000)	<i>Chlamydia</i> infekció (nyúl), cHsp60 (Yi, 1993)	Saját eredmények, IVIG-Hsp60 (III.)	Saját eredmények, ISZB-Hsp65 (jelen dolgozat)
1: 52-81 KF	-			+			+	+	+
2: 117-146 ÉF KF	Citokeratin/ rheumatoid arthritis	+	+			+	+	+	+
3: 162-186 KF	Neurofilament triplet M protein/Sclerosis multiplex					+	+	+	+
4: 203-238 BF	Laminin β -2 lánc/bazálmembrán károsodás (?)	+		+	+	+	+	+	+
5: 239-262 BF	-		+	+		+	+		+
6: 303-317 BF	-					+	+	+	+
7: 368-387 BF	Laminin β -2 lánc/Goodpasture szindróma				+	+		+	+
8: 394-413 KF	Glutaminsav dekarboxiláz (GAD)/diabetes mellitus I. típus					+		+	+
9: 436-455 KF	Dihidrolipoamid dehidrogenáz/primér biliáris cirrózis					+	+	+	+
10: 470-484 ÉF	Acetilcolin receptor /myasthenia gravis		+			+	+		+
11: 485-509 KF	KU autoimmun antigén/Scleroderma				+	+	+		+
12: 531-550 BF	-	+				+			+

*A számozás a humán Hsp60 aminosav sorrendjének megfelelő. Csak azok az epitópok vannak feltüntetve, melyek ellen saját vizsgálatunkban antitestek voltak kimutathatóak. A hivatkozott cikkekben ezeknél több epitóp jellemzése is megtalálható, ezeket ld. [a 9. ábrán](#). KF: külső felszín, BF: belső felszín, ÉF: érintkezési felszín a tetradecamer molekulán. ** Csak az adjuváns arthritisszel szemben védelmet jelentő 3 epitóp van feltüntetve.

Humán	MLRLPT VFRQMRPVSRLAPHLTRAY						26
Rt	M----S - KQI--V-H --GDQ-CR--						12
	1						
Humán	AKDVKFGADA	RALMLQGVDL	LADAVAVTMTG	PKGRTVIEEQ	SWGSPKVTKD	GVTVAKSIDL	86
Rt	K---K-----	---IIEGINV	VANAVGITLG	PKGRCVAIEQ	SYGPPKITKD	GVSVAKAIQL	61
Pg	M-AKEIKFDMES	RDLLKKGVDA	LPNAVKVTLG	PKVRNVILSK	TYGAPHITKD	GVSVAKEIEL	61
Ct	VAKNIKYNEEA	RKKIQKGVKT	LAEAVKVTLG	PKGRHVVIDK	SFGSPQVTKD	GVTVAKEVEL	61
M bovis	AKTIAYDEEA	RRGLERGLNA	LADAVKVTLG	PKGRNVVLEK	KWGAPITND	GVSIAKEIEL	60
	2						
Humán	KDKYKNIGAK	LVQDVANNTN	EEAGDGTTTA	TVLARSIAKE	GFEKISKGAN	PVEIRRGVML	146
Rt	KDKSLNVGAQ	FVISVASKTA	DVAGDGTTTA	TVIADAAVRE	LNKAEVAGID	IQEVRKGAEK	121
Pg	ECPFENMGAQ	LVKEVASKTN	DDAGDGTTTA	TIQAQSIIGV	GLKNVTAGAN	PMDLNRGIDK	121
Ct	ADKHENMGAQ	MVKEVASKTA	DKAGDGTTTA	TVLAEAIYTE	GLRNVTAGAN	PMDLKRGRIDK	121
M bovis	EDPYEKIGAE	LVKEVAKKTD	DVAGDGTTTA	TVLAQALVRE	GLRNVAAGAN	PLGLKRGIEK	120
	3						
Humán	AVDAVIAELK	KQSKPV-TTPE	EIAQVATISA	NGDKEIGNII	SDAMKKVGRK	GVITVKDGKT	206
Rt	AVEAVIADVR	KNSSPV-KNEE	EIAQVATVSS	NGDREIGEKI	ANAMKQVGQE	GVITVEDSKN	181
Pg	SVKSVVTHIA	GMAKEVGADFQ	KIEHVAKISA	NGDENIGSLI	AEAMRKVKKE	GVITVEEAKG	182
Ct	AVKVVVDQIR	KISKPV-QHHK	EIAQVATISA	NNDAEIGNLI	AEAMEKVGKN	GSITVEEAKG	181
M bovis	AVEKVTETLL	KGAKEV-ETKE	QIAATAAISA	-GDQSIGDLI	AEAMDKVGNE	GVITVEESNT	179
	4						
Humán	LNDELEIIIEG	MKFDRGYISP	YFINTSKGQK	CEFQDAYVLL	SEKKISSIQS	IVPALEIANA	266
Rt	FNFEVEVVKG	MRFDRGYISQ	YFATNREKMI	TEFENPYILL	LDQKVSTVQP	LVPVLEAVAH	241
Pg	TDTTVEVVEG	MOFDRGYISP	YFVTNTDKME	VQMPNPFILI	YDKKISVLKE	MLPILEQTVQ	242
Ct	FETVLDIVEG	MNFNRGYLSS	YFATNPETQE	CVLEDALVLI	YDKKISGIKD	FLPVLOQVAE	241
M bovis	FGQLLELTEG	MRFDKGYISG	YFVTDPERQE	AVLEDPYILL	VSSKVSIVKD	ILPILKVKIG	239
	5						
Humán	HRKPLVIIAE	DVDGEALSTL	VLNRLKVGLQ	VVAVKAPGFG	DNRKNQLKDM	AATGGAVFG	326
Rt	TGKPLVLIAD	DVDGEALTAL	ILNNLKGSIK	VVAVKAPGFG	DRKKEMLEDI	AILTNGEVIT	301
Pg	TGKPLIIIAE	DNDSEALPTL	VVNRLRGSLLK	ICAVKAPGFG	DRRKAMLEDI	AILTGGAVIS	302
Ct	SGRPLIIIAE	DIEGEALATL	VVNRIIRGGFR	VCAVKAPGFG	DRRKAMLEDI	AILTGGQLIS	301
M bovis	AGKPLIIIAE	DVEGEALSTL	VVNKIRGTFK	SVAVKAPGFG	DRRKAMQDM	AILTGGQVIS	299
	6						
Humán	EE-GLTLNLE	DV-QPHDLGK	VGEVIVTKDD	AMLL--KGKG	D-KAQIEKRI	QEIIIEQLDVT	381
Rt	TE-QLGIKLE	KVNDSKLTG	ANRVIVTKDH	TTIVHDKNNS	DIEKKVNSRC	EQIREAIKDT	359
Pg	E--ETGLNLE	N-TTMDMLGT	AEKVRVDKDN	TTIVNGAGNK	E---GIASRI	TOIKAQIENT	356
Ct	EELGMKLENA	N-LAMLGKAK	--KVIVSKED	TTIVEGMGEK	E---ALEARC	ESIKKQIEDS	356
M bovis	EEVGLTLENA	DLSLLGKARK	--VVVTKDE	TTIVEGAGDT	DA-IAGRVAQ	IRQ-EIEN-S	353
	7						
Humán	TSEYEKEKLN	ERLAKLSGCV	AVLKVGGS	VEVNEKKDRV	TDALNATRAA	VEEGIVLGGG	441
Rt	TSDYEKEKLQ	ERLAKLRNGV	AVLKVGGA	VEQKERKDRV	EDALHATRAA	VEEGIVPGGG	419
Pg	TSDYDREKLQ	ERLAKLAGGV	AVLYVGAASE	VEMKEKKDRV	EDPLSPTRPP	IEEGTVPGGG	416
Ct	SSDYDKEKLQ	ERLAKLSGGV	AVIRVGAATE	IEMKEKKDRV	DDAQHATIAA	VEEGILPGGG	415
M bovis	DSDYDREKLQ	ERLAKLAGGV	AVIKAGAATE	VELKERKHRI	EDAVRNAKAA	VEEGIVAGGG	413
	8						9
Humán	CALLRCIPAL	DS-L-TPANEDQ	KIGIEIIKRT	LKIPAMTIAK	NAGVEGSLIV	EKIMQSS-SE	500
Rt	VALFYASRVL	DS-L-KFDNEDQ	RVGINIIKKV	LEAPVRQIVK	NAGGKEDVVV	NELSKSTDKN	479
Pg	TTYIRAI AAL	EG-L-KGENEDE	TTGIEIVKRA	IEEPLRQIVA	NAG-KEGAVM	VQKVKEGKDD	475
Ct	TALIRCIPTL	EAFLPMLTNEDE	OIGARIVLKA	LSAPLKQIAA	NAG-KEGAIL	FOQVMSRSAN	476
M bovis	VTLLOAAPT	DE-L-KLEGDEA	T-CANIVKVA	LEAPLKQIAF	NSGLEPGVVA	EKVRNLP-AG	471
	10						11
Humán	VGYDAMAGDF	VNMVEKGIID	PTKVVRTALL	DAAGVASL-L	TTAEVVVTEI	PKEEKDPGMG	559
Rt	RGFDARTMOY	VDMIKAGIVD	PTKVVRTALQ	DAFSVASL-V	IATSAMITD-	-HEEDNNTGN	536
Pg	FGYNARTDVF	ENLYTTGVID	PAKVTRVALE	NAASIAGMFL	TTECVIADKK	EDNP-AAPAM	534
Ct	EGYDALRDAY	TDMLEAGILD	PAKVTRSALE	SAASVAGLLL	TTEA-LIAEI	PEEKPAAPAA	536
M bovis	HGLNAQTGVY	EDLLAAGVAD	PVKVTRSALE	NAASIAGLFL	TTEA-VVADK	P--EKEKASV	528
	12						
Humán	AMGGMGGGGMG	GGM-F					573
Rt	RSGGGVGGGH	HGGMGGMDF					555
Pg	PGGM-GGMGG	MM					545
Ct	MPGAG--MDY						544
M bovis	P-GG-GDMGG	--MDF					539

A Hsp60 és a Hsp65 B-sejt epitóp struktúrájában talált különbségek mellett egy további, funkcionális eltérést is találtunk a két molekula között. A humán Hsp60 képes aktiválni a komplementrendszer specifikus antitestek jelenlétében, a Hsp65 azonban nem. A különbség feltehetően az aktivációt elindító antitestek sajátjaiban van. Az anti-Hsp60 autoantitestek szintje igen szoros pozitív korrelációt mutatott a komplementaktiváció mértékével. Ez az összefüggés nem meglepő, hiszen Schett és munkatársai korábban *in vitro* sejt kultúrákon kimutatták, hogy az anti-Hsp60 antitestek képesek komplement mediálta úton károsítani a célsejteket (Schett, 1995, Schett 1997). Ez a károsító hatás azonban csak akkor működött, ha a target sejteket előzőleg stresszhatásnak tették ki. Az is ismert, hogy a stresszhatás fokozott Hsp60 expressziót okoz, és a hősokkfehérjék meg is jelenhetnek a target sejt plazmamembránjában, ahol antitestek célpontját képezik (Hochleitner, 2000). Ezeket az ismereteket a Wick-elméletben úgy foglalták össze, hogy az infekciók hatására megjelenő anti-Hsp65 antitestek keresztreakáló csoportjai akkor válnak patogénné az atherosclerosis vonatkozásában, ha stressz tényezők (pl. nyíróerő hiprtóniában, oxidált LDL molekula, infekciók okozta gyulladás) hatására az endothelsejtek Hsp60-at expresszálnak membránjukon (Wick, 2001).

A Hsp60 indukálta komplementaktiváció mérésével olyan eljárás került a kezünkbe, mellyel a patogenetikai szerepet játszó komplementaktiváló autoantitesteket vagyunk képesek mérni. A mérési eljárás alapján diagnosztikus teszt kit-et fejlesztettünk a skóciai Omega Diagnostics and Therapeutics céggel (AtheroRisk). Az AtheroRisk kit első kipróbálására fokozott kardiovaszkuláris rizikónak kitett gyermekek esetében került sor. Méréseink szerint a komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek a hagyományos rizikófaktoroktól függetlenül jelzik a családi rizikó növekedését. Ez az összefüggés erősebb a komplementaktiváló antitestek esetében, mint az össz IgG anti-Hsp60 antitesteknél.

A hősokkfehérjék komplementaktiváló képességének vizsgálatát tovább folytattuk, és más hősokkfehérje családokra (Hsp70 és Hsp90) is kiterjesztettük (Prohászka, 2002). Míg a Hsp70 esetén erős, direkt, C1q-n keresztül beinduló klasszikus reakcióút aktiválódást tapasztaltunk, addig a Hsp90 molekula nem bizonyult komplementaktiválónak. A Hsp60-ról és Hsp70-ről ismertté vált, hogy a természetes immunrendszer sejtjeit képes aktiválni mintázatfelismerő receptorokon keresztül. Ez az aktiváció az antigénfeldolgozást végző sejtek szintjén zajlik és fontos szabályozója az adaptív immunválasznak. A hősokkfehérjék komplementaktivációjára vonatkozó eredményeink jól illeszkednek abba az összképbe, ami az ősi veszélyt jelző molekulák és a természetes immunitás kapcsolatáról kialakulóban van (XX. és XXI...emiatt át kell számozni majd...).

További munkahipotézisünk ismertetése

A fenti eredményeink további vizsgálatainkat a természetes autoantitestek felé irányították. A következő megfigyelések sugallták azt, hogy az atherogenesisben fontos szerepet játszó anti-Hsp60

autoantitestek a természetes autoantitestek közé tartozhatnak: nem találtunk direkt összefüggést lezajlott infekciók szerológiai markereivel (I.); az anti-Hsp60 autoantitestek szintje hosszú időn keresztül stabilnak mutatkozott (I.) és nem tudtunk kimutatni emelkedett anti-Hsp60 szinteket olyan állapotokban (V. és VI. cikkek), melyekre a poliklonális B-sejt aktiváció jellemző. *Munkahipotézisünk* szerint a saját Hsp60 antigénnel mért antitestek a természetes autoantitest repertoárral mutatnak összefüggést, melynek szerepe a saját védelme, míg a bakteriális Hsp65-tel mért antitestek közvetlenebb módon mutatják a lezajlott infekciók utáni keresztreagáló, de eredetileg az infekcióval szemben protektív („immun”) antitesteket. A következő fejezetekben azok a megfigyelések kerülnek ismertetésre, melyek független vizsgálatokban megerősítik ezt a feltételezésünket. Először a természetes autoantitestek sajátosságainak ismertetése következik majd azok a vizsgálatok, melyek alátámasztják, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek a természetes autoantitestek közé tartoznak.

2, Az anti-Hsp60 autoantitestek, mint természetes autoantitestek

A természetes autoantitestek jellegzetességei

Az egészséges személyekben kimutatható, saját antigénekkal reagáló antitestek ismerete több, mint 100 évre tekint vissza (Besredka, 1901). A klónszelekciós elmélet uralkodása és az a tény, hogy az elsőként leírt autoimmun betegségekben autoantitesteket találtak, évekre meghatározta azt a nézetet, hogy az autoreaktivitás szükségszerűen betegségek velejárója. Elsőként Jerne vetette fel (Jerne, 1974), hogy az immunglobulinok variábilis régiói ellen kimutatható antitestek az egészséges immunrendszer szükséges alkotóelemei. Ma már elfogadott tény, hogy az immunrendszer részét képezik a saját antigénekkal reagáló T- és B-sejtek (Hayakawa, 1999, Lacroix-Desmazes, 1998). Azokat a saját vagy idegen antigénekkal reagáló antitesteket, melyeket a célantigénnel való ismert immunizálás nélkül is ki lehet mutatni egy adott szervezetben, *természetes antitesteknek* nevezzük. A természetes antitestek részhalmazát képezik azok a saját antigéneket felismerő autoantitestek, melyeket *természetes autoantitesteknek* nevezünk.

A természetes autoantitestek alacsony affinitású (K_d 10^{-5} - 10^{-8} M), polireaktív antitestek. A természetes autoantitestek alacsony affinitása és polireaktivitása újfajta biológiai tulajdonságot, *hálózati működést* eredményezhet. Ebben az értelmezésben egy adott antitest működése nem jellemezhető a hálózat többi elemének ismerete nélkül, azaz a hálózat egy-egy csomópontjának ismeretéből nem következtethetünk a hálózat egészének felépítésére, reakciójára. A polireaktivitás nem jelenti a specificitás hiányát, minden természetes autoantitest a saját maga, jól definiálható, egyedi epitópját (epitópjait) ismeri fel. Ez a fajta alaptulajdonság szorosan összefügg a természetes autoantitestek kapcsoltságával, vagyis azzal a tulajdonságukkal, hogy igen nagy arányban ismerik fel a más antitestek V régiójában elhelyezkedő struktúrákat. A természetes autoantitestek között találhatók IgM izotípusúak, ám emberben dominál az IgG (Avrameas, 1991). Az izotípus váltást biztosító folyamatok ma még nem ismertek, egyes feltételezések szerint az autoreaktív B-sejtek képesek a T-sejtekkel való kapcsolat nélküli átváltásra is (Durandy, 1993).

A természetes autoantitestek szerepének felismerését kezdetben nehezítette a rendelkezésre álló metodikák korlátozott volta. Az előbbieken ismertetett alapvető tulajdonságok miatt ugyanis csak részeredményhez vezethetett egy-egy antigén ellen vizsgált, egy adott természetes autoantitest. Feltételezték, hogy a természetes autoantitestek részt vesznek a kórokozók elleni védekezésben mint azonnali opszonizáló tényezők; hozzájárulhatnak az öregedő sejtek eltakarításához, a malignusan transzformálódott sejtek elleni védekezéshez, az

antigénprezentációhoz, és hogy szerepük lehet a gyulladásos válaszreakció fékezésében is (Lacroix-Desmazes, 1998). Az áttörést ezen a téren a 90-es évek közepén erre a célra bevezetett *kvantitatív immunoblot* technika jelentette (Nobrega, 1993). Ennek segítségével lehetőség nyílt arra, hogy teljes szöveti extraktumok, kórokozók vagy más idegen fehérjék ellen (egyszerre akár több száz antigént vizsgálva) egy adott egyed immunglobulin repertoárját felmérjék. Ezek a kísérletek alapvető felismerésekhez vezettek. Kiderült, hogy egészséges emberek keringő IgG természetes autoantitest készlete összesen kb. tíz egynéhány fehérje ellen irányul, és a mintázat igen konzervált módon követhető a vizsgálati személyekben éveken keresztül (Mouthon, 1995a). Különbséget lehetett találni az egyes antigének ellen mutatott egyedi reaktivitások között, de a mintázat az adott személyben konzervált, stabil volt. További fontos felismerés, hogy egy adott egyedre jellemző a saját immunglobulin repertoárja, és az élet során ez változatlan formában van jelen (Mouthon, 1995b, 1996). Ugyanezekben a szérumokban viszont igen eltérő mintázatokat lehetett kimutatni idegen antigének (bakteriális extraktumok) ellen. Ezen eredményekre alapozva Coutinho és munkacsoportja felvetette (Vasconcellos, 1998), hogy genetikai tényezők szabályozzák a természetes autoantitest repertoár jellegét és mértékét, s ez nagymértékben független a külső antigén ingerektől és az adott személy immunológiai előéletétől.

A *természetes autoantitest repertoár* az ontogenezis során pozitív szelekció eredményeként válogatódik. A köldökzsinór vérben a repertoár IgM izotípusú tagjait ki lehet mutatni, az élet első 2-4 évében további érés történik, izotípus váltás után dominálni kezdenek az IgG természetes autoantitestek (Mouthon, 1996). Ez az IgG repertoár az élet során stabilan, változatlan mennyiségben megőrződik, ami által az immunrendszer képes a kiválasztott saját antigének védelmére. Ezt az elméletet megerősíti, hogy a természetes autoantitestek V régiói a csíravonalban kódoltak (Baccala, 1989), és ezekben a régiókban további mutáció ritkán történik. Amennyiben azonban mégis mutáció következik be, akkor az autoantitestek polireaktivitása vagy affinitása fokozódhat (Ichiyoshi, 1995).

Ennek az antitest repertoárnak, a sajáttal reagáló T-sejt repertoárral együtt képzett egységét Irun Cohen az *immunológiai homunkulusz* névvel illette, mellyel arra utalt, hogy az immunrendszer a sajátot jelentő lényeges információt önmagában - hálózatot képező antitestekkel és regulátoros T-sejtekkel - kódolja, képezi le (Cohen, 1991).

Hsp60, mint a természetes autoantitestek célantigénje

A hősokkfehérjék elemi biokémiai funkciójuknál fogva nélkülözhetetlen fehérjék, homológ felépítésű és azonos működésű tagjaikat minden élőlényben meg lehet találni. Nagyfokú

konzerváltságuk és stresszhatásra fellépő fokozott expressziós szintjük alapján a kórokozók hősokkfehérjei ideális célpontjai a gazdaszervezet védekezési reakcióinak egy fertőzés során. Az emlős szervezet is rendelkezik azonban hasonló felépítésű és funkciójú molekulákkal. Az *E. coli* GroEL fehérjeje és az ember hasonló mitokondriális Hsp60 molekulája között aminosav szinten 45% azonosság mutatható ki, de hasonló szintű szekvencia homológia van egyéb kórokozók és más hősokkfehérjék (pl. Hsp70 család) között is. A fertőzések során indukálódó Hsp specifikus immunválasz nagy valószínűséggel károsíthatná a fertőzés helyén a saját Hsp-eket vagy azokhoz antigénstruktúrájukban hasonló fehérjét expresszáló sejteket. Ilyen jellegű (a Hsp-k keresztreakcióján nyugvó) mechanizmusok lehetőségét több autoantigén és betegség vonatkozásában is felvetették már (Jones, 1993). Az autoimmunitás megelőzésének egyik lehetősége a hősokkfehérjék speciális védelme, melynek egyik formája a hősokkfehérjék leképezése az immunológiai homunkuluszban. Ezzel összhangban egészséges emberek keringésében kimutathatók anti-Hsp60 autoantitestek és Hsp60 specifikus T-sejtek is (Cohen 1991a, Fischer, 1992). Ezt a megfigyelést saját eredményeink (I. cikk, és egészséges magyar és finn véradók) és egy angol munkacsoport megfigyelései is alátámasztják (Pockley, 1999). 2002-ben Pashov és mtsai vizsgálata újabb bizonyítékot szolgáltatott ehhez az elmélethez, ugyanis a Hsp90 fehérjéről mutatták ki, hogy természetes autoantitestek célpontját képezi. Azóta újabb eredmények is napvilágot láttak a Hsp60 és a természetes autoantitestek összefüggéseiről (Quintana, 2003).

Az előző fejezetben összefoglalt eredmények alapján azt feltételeztük, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek a természetes autoantitest repertoárba tartozhatnak. A következő bekezdésekben bemutatott kísérletekkel sikerült ezt a hipotézisünket kívánnunk alátámasztani, és vizsgáltuk, hogy vannak-e az anti-Hsp60 autoantitesteknek a természetes autoantitestekre jellemző tulajdonságaik. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy anti-Hsp60 reaktivitású polireaktív IgM klónok jelen vannak az újszülött egér lépsejtjeiből készített hibridóma könyvtárban. Igazoltuk, hogy Hsp60 reaktivitású IgM antitestek újszülött csecsemők köldökzsinór vérében jelen vannak. Egészséges felnőttek szérumait vizsgálva pedig azt találtuk, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek szintje 5 éves követés során nem változik, stabil a vizsgált személyekben.

Egér embrionális hibridómák polireaktív, Hsp60-at is felismerő IgM antitesteket termelnek

Az újszülött egerek B-sejtjei túlnyomórészt a B1-sejtek csoportjába tartoznak, jellegzetességük a IgM^{magas}, IgD^{alacsony}, B220^{alacsony}, részben a CD5 expresszió, valamint az autonóm proliferációs képesség és hosszú élettartam. A B1-sejtek nagy része természetes autoantitesteket termel, melyek intracelluláris antigénekkal (mint pl. citoskeletális fehérjék,

magi struktúrák és mitokondriumok) reagálnak (Casali, 1989) és polireaktívak. Kollaborációs munka keretében lehetőségünk nyílt egy 32 klónból álló egér IgM antitest panelben elvégezni az anti-Hsp60 IgM antitest méréseket. Ezen antitestek BSA-val, DNS-sel, aktinnal (Cervenak, 1999) és koleszterinnel (Bíró, 2005, közlés előtt) való reaktivitását már felmérték.

Az IgM anti-Hsp60 autoantitestek mérése a következők szerint történt: 5 µg/ml humán Hsp60-nal fedett ELISA lemezeket inkubáltunk a monoklonális antitestek különböző hígításaival, a mintával való inkubáció 4 °C-on történt, majd a lemezeket nyúl anti-humán IgG-POX és anti-nyúl-IgG-POX konjugátumokkal hívtuk elő a specifikus jel felerősítése céljából.

A 6. táblázatban a korábbi adatokkal együtt, összefoglalva láthatók méréseink eredményei.

6. táblázat: Újszületett egér monoklonális IgM antitest panel reaktivitási mintázata egyes antigénekkal*.

Klón	TNP-BSA	FITC-BSA	BSA	DNS	Aktin	Koleszterin	Hsp60	pozitív
1/1								4
1/4								4
1/5								5
1/11								4
2/3								6
2/5								4
2/10						-	-	5
2/13								5
2/15								4
2/21								5
3/9								5
3/17								6
3/25								3
4/5								3
4/6								5
4/12								3
4/18						-	-	4
4/20								2
4/21								7
4/26						-	-	4
6/17								3
6/26								5
6/31						-	-	5
6/34								6
7/1								3
7/8								4
7/14						-	-	1
7/16								5
7/20								6
7/21						-	-	5
8/8								7
8/14								5

*A reaktivitás erőssége szűrkeskálán került jelölésre. Fekete: ha az adott antitest 1:400-as, sötétszürke, ha 1:100-as, világosszürke ha 1:20-as hígításban >0,1 OD-t ad; fehér, ha OD minden hígításban <0,1. TNP: 2,4,6 trinitrophenyl; FITC: fluoreszcein izotiocianát, BSA: bovin szérum albumin.

32 klón közül 26-ban állt rendelkezésünkre elegendő minta a mérések elvégzéséhez. A 26 klón között 5 olyat találtunk, amelyek felismerték a Hsp60-at is, ezek a klónok legalább 5 antigénnel reagáltak a vizsgált 7 antigén közül. Két klón mind a 7 antigénnel reagált.

Kiemelendő, hogy a vizsgált antigének között szekvencia vagy működésbeli hasonlóság nem mutatható ki, két antigén haptén (TNP- és FITC-BSA) jellegű. A vizsgált antigének közül a Hsp60 mutatta a leggyengébb reakciót, aminek magyarázata lehet, hogy emberi Hsp60-at használtunk antigénként és nem egér Hsp60-at.

Emberi köldökzsínór vérben kimutathatók IgM anti-Hsp60 autoantitestek

Az egészséges újszülöttek köldökzsínór szérummintájában detektálható anti-Hsp60 autoantitestek vizsgálatára kollaborációs vizsgálatot szerveztünk a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársaival. Konszekutív módon, tájékozott beleegyezést követően 51 fiatalasszony vett részt a vizsgálatban, a vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. Az anyák életkora 28 (medián) év volt (tartomány 17-41), 45%-uk soha nem dohányzott, 42% korábban dohányzott, 13% a terhesség alatt is dohányzott. A vizsgálat résztvevői egészséges, érett újszülöttet (51% leány) hoztak világra komplikációmentes terhességet követően spontán hüvelyi szüléssel. Az 51 újszülöttől a születés után közvetlenül a köldökzsínór vénából történt a mintavétel, míg az édesanyáktól a szülést követő 12 órán belül standard vénás vérvétel történt. A szérummintákat közvetlenül a mintavétel után centrifugálással szeparáltuk és -70 °C-on tároltuk.

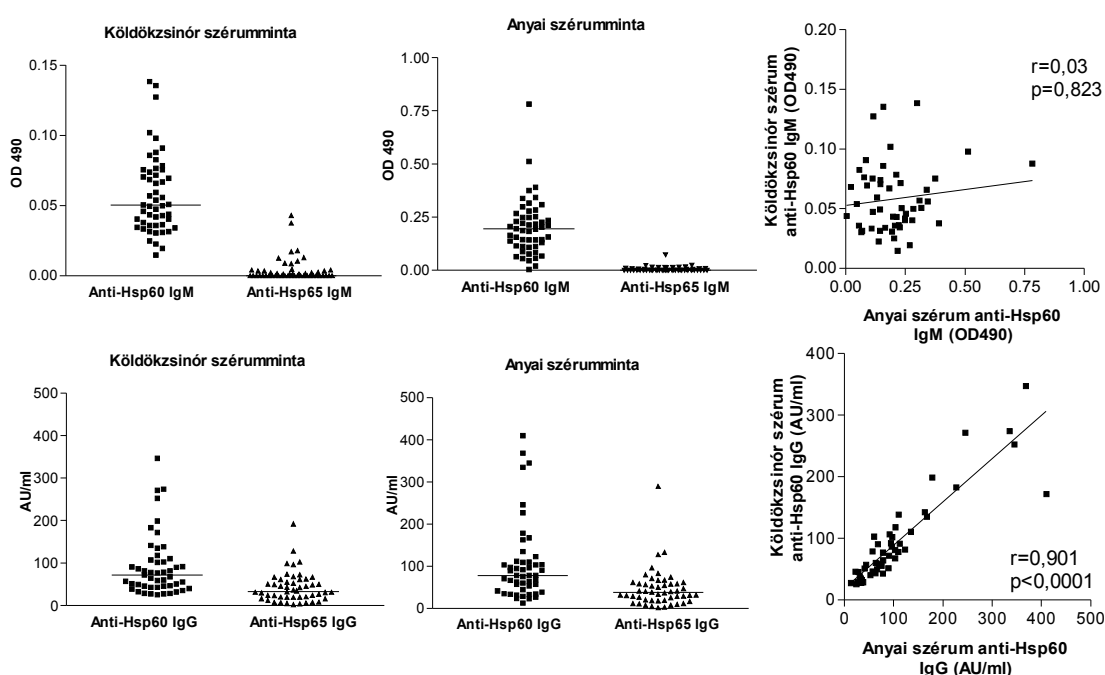
A szérummintákból össz-IgG és -IgM meghatározást végeztünk. Tekintettel arra, hogy a köldökzsínór vérben az IgG és IgM a hagyományos, felnőttkori értékekre beállított mérések szerint méréshatár alattinak mutatkozott, saját ELISA mérést állítottunk be. Ennek során az ELISA lemezeket egér anti-humán IgG ill. IgM ellenanyagokkal fedtük, majd a mintával történt inkubáció után nyúl anti-humán IgG- ill. IgM-peroxidáz konjugátumokkal hívtuk elő. Standardnak tisztított emberi IgG és IgM preparátumokat használtunk. Meghatároztuk továbbá az anti-Hsp60 valamint az anti-Hsp65 IgG és IgM specifikus antitestszinteket ezekben a mintákban. Az anti-Hsp IgG meghatározások a I. cikkben leírtak szerint történtek, az anyai mintákat 1:400, a köldökzsínór mintákat 1:20 arányban hígítottuk, az így kapott OD értékeket standard görbéhez viszonyítottuk és AU/ml-ben értékben fejeztük ki.

Az IgM anti-Hsp60 méréseket 5 µg/ml Hsp60-nal fedett ELISA lemezeken végeztük, a mintával való inkubáció 4 °C-on történt, majd a lemezeket nyúl anti-humán IgG-POX és anti-nyúl-IgG-POX konjugátumokkal hívtuk elő a specifikus jel felerősítése céljából. Az IgM meghatározáshoz nem rendelkezünk standardként használható, magas titerű szérummintával,

így ezeknek a méréseknek az eredményeit OD értékben fejeztük ki. Az összes minta mérése egy napon, két ELISA lemezen történt, a két lemez között – az ismételt minták tanúsága szerint – nem volt különbség, így normalizálásra nem volt szükség.

Az anyai szérummintákban 8,17 g/l (6,7-9,54) össz-IgG koncentrációt találtunk, míg a köldökzsinór szérummintákban ez az érték 9,93 g/l (8,61-11,8) volt. Az össz-IgM vonatkozásában a következő értékeket kaptuk: anyai minták 1,56 g/l (0,86-2,2), köldökzsinór minták: 0,073 g/l (0,056-0,103). Ezek az adatok az ismert (életkor szerinti) fiziológiás értékeknek megfelelnek.

A 10. ábrán a specifikus, anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitestszinteket tüntettük fel. Minden anyai és köldökzsinór mintában ki tudtunk mutatni IgM és IgG típusú anti-Hsp60 autoantitestet. Az IgG-anti-Hsp60 autoantitestek az anyai és köldökzsinór mintákban igen szoros korrelációt mutattak egymással, ami megfelel annak az irodalmi ismeretnek, hogy az anyai IgG a placentán átjutva megjelenik a magzat keringésében.



10. ábra: Az anti-Hsp60 autoantitestek és anti-Hsp65 antitestek előfordulása anyai és köldökzsinór vérmintákban. Az ábrán párhuzamos mérések háttérrel korrigált átlagai vannak feltüntetve.

Ezzel szemben az IgM nem jut át a placentán. Eredményeink, melyek szerint nincs korreláció a magzati és anyai anti-Hsp60 IgM-szintek között, arra utalnak, hogy eltérő tényezők szabályozzák az anyában és a magzatban ezeknek az antitesteknek a mennyiségét. IgM-anti-Hsp65 antitestet az anyai szérummintákban nem találtunk, a köldökzsinór minták közül 9-ben

mértünk igen alacsony reaktivitást. Ezek az eredmények megfelelnek annak a vizsgálati kritériumunknak, hogy csak egészséges, fertőzésen aktuálisan át nem esett személyeket vontunk be. Nem találtunk szignifikáns korrelációt sem az anyai IgG-anti-Hsp60 és IgM-anti-Hsp60 között, sem a magzati IgG-anti-Hsp60 és IgM-anti-Hsp60 között.

Az anti-Hsp60 autoantitestek szintje éveken keresztül stabil egészséges felnőttekben

A Second Northwick Park Heart Study (NPHSII) olyan populációs vizsgálat volt Nagy-Britanniában, melyben középkorú brit férfiak kardiovaszkuláris morbiditását és mortalitását mérték fel. A vizsgálat tervezését és eredményeit Miller és munkatársai közzölték 1996-ban (Miller, 1996). 4600, 50-61 éves férfi került bevonásra 9 orvosi körzetben 1 év alatt, majd ezeket a férfiakat követték 5 éven keresztül. 3 alkalommal történt vérminta vétel: a vizsgálatba való bevonáskor, a vizsgálat 3. és 5. évében. A vizsgálatba csak egészséges emberek kerültek be, kizáró okok voltak: instabil angina pectoris vagy myocardialis infarktus az anamnézisben, patológiás Q-hullám az EKG-n, thrombocita-aggregáció gátló kezelés, agyi érbetegség, malignus betegség, hepatitis B vagy C fertőzés, cukorbetegség, hipertónia, máj-, pajzsmirigy- vagy vesefunkció eltérések, emelkedett szérumszint. 2001-ben lehetőségünk nyílt arra, hogy az 5 éves követés során kardiovaszkuláris eseményt el nem szenvedett, és más szempontból is egészségesnek bizonyult személyek 3 vérmintájában meghatározzuk az anti-Hsp60 IgG antitestek szintjét. A több ezer kontroll személy mintái közül véletlenszerű kiválasztás után bocsátottak rendelkezésünkre 3x48 mintát. Az antitestek meghatározása a I. cikkben leírtak szerint történt.

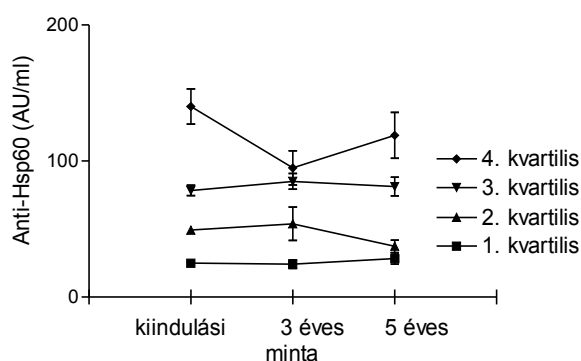
A kiindulási szérumszintekben lognormál eloszlásban találtunk anti-Hsp60 autoantitesteket, a csoport medián értéke 62,4 AU/ml volt. Ez az antitestszint nem változott szignifikáns mértékben 3 év eltelte után a 48 sikeresen követett, egészséges középkorú férfiban. A vizsgálat 5. évének letelte után is gyakorlatilag azonos anti-Hsp60 autoantitestszint volt mérhető a csoportban (51,6 AU/ml, $p=0,440$, 7. táblázat).

7. táblázat: Anti-Hsp60 autoantitestek mennyiségének alakulása 5 éves követés alatt egészséges brit férfiakban

	Kiindulási	3 éves	5 éves
	minta		
Anti-Hsp60 szint (AU/ml, n=48)	62.4 (32.9-99.5)*	53.5 (35.2-84.3)*	51.6 (31.8-97.1)*
Korreláció 3 éves mintával	0,806 ($<0,0001$)**	-	-
Korreláció 5 éves mintával	0,817 ($<0,0001$)**	0,845 ($<0,0001$)**	-

*medián (interkvartilis tartomány); **korrelációs együttható (p)

Az antitestszintek a 3 időpontban igen szoros korrelációt mutattak a csoportok között, ami arra utal, hogy az egyes emberek antitestszintje (a csoport átlagához hasonlóan) csak kis mértékben változott. Ezt megerősítendő a 48 vizsgált mintát 4 csoportba osztottuk az anti-Hsp60 autoantitestszinteknek (25%-50%-75% percentilisek értékeit, mint vágópontokat alkalmazva) megfelelően (11. ábra).



11. ábra: Az anti-Hsp60 autoantitest koncentrációk változása egészséges brit férfiakban. A kezdetben alacsony, közepes, magas, legmagasabb antitestszintekkel rendelkezőkben mért további adatok csoportosítva kerültek bemutatásra (átlag±SEM).

Az ábrán az egyes alcsoportok átlagait és az átlag standard hibáját tüntettük fel a követési idő függvényében. Jól látható, hogy akik a vizsgálat indulásakor alacsony antitest mennyiséggel rendelkeztek, ugyanazok a vizsgálat végén is megőrizték azt, illetve fordítva, akik magas antitestszinttel rendelkeztek kezdetben, ugyanazok 5 évvel később is magas szintet mutattak.

Megbeszélés és a további munkahipotézis ismertetése

Az anti-Hsp60 autoantitestek vizsgálatát Wick és munkatársai elmélete alapján kezdtük el, mely szerint az atherosclerosisban kimutatható anti-Hsp60 autoantitestek kiváltói a korábban elszenvedett infekciók. A fertőzések során indukálódó, és a saját Hsp60-nal keresztreakáló antitestek károsíthatják az erek falát, ha ott a klasszikus rizikófaktorok hatására a hő sokkfehérjék fokozott mértékben jelennek meg. Eredményeink azonban fokozatosan új munkahipotézis megfogalmazását eredményezték, amit a 44. oldalon foglaltunk össze. Új munkahipotézisünk megfogalmazását az tette lehetővé, hogy összehasonlító vizsgálatnak vetettük alá az anti-bakteriális és anti-humán Hsp antitesteket, melynek során lényeges különbségeket derítettünk fel ezen antitestek felépítésében és működésében. Eredményeink arra utaltak, hogy a saját Hsp60-nal reagáló antitesteknek két forrása lehet. Keletkezhetnek ilyen autoantitestek valóban az infekciók során is, azonban feltehető, hogy a természetes

autoantitest repertoárban is található Hsp60-at felismerő autoantitestek, melyek működése érbetegségekben megváltozik.

Anti-Hsp60 autoantitestek, mint a természetes autoantitest repertoár részei

Három vizsgálatot terveztünk annak bizonyítására, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek részét képezik a természetes autoantitest repertoárnak. Újszülött egér lépéből készített IgM hibridóma könyvtár klónjait vizsgálva sikerült kimutatnunk polireaktív antitesteket, melyek több antigént is felismernek. Vizsgáltunk haptén, fehérje, nukleinsav és lipid természetű antigéneket is. A vizsgált klónok majdnem 20%-a ismerte fel a Hsp60-at is, ezen klónok nagy része legalább 5 féle antigénnel reagált. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Hsp60 reaktivitású antitestek előfordulása igen valószínű antigéningernek ki nem tett szervezet autoantitest repertoárjában. Megfigyeléseink teljes összhangban vannak Pashov és munkatársai eredményeivel (Pashov, 2002), akik Hsp90 oszlopon affinitás kromatográfiával tisztított IgG és IgM antitestekről mutatták ki, hogy szöveti extraktum több tucat fehérjéjét is felismerik, azaz polireaktívak.

Újszülött, egészséges csecsemők köldökzsínór vérében sikerült kimutatnunk anti-Hsp60 IgM antitestek jelenlétét. Ez a megfigyelésünk alátámasztja, hogy az emberi természetes autoantitest repertoárnak is részét képezik Hsp60-nal reagáló antitestek a születéstől fogva. Érdekes további megfigyelésünk, hogy ugyanezekben a savómintákban nem tudtunk Hsp65 reaktivitású IgM antitesteket kimutatni, ami megerősíti az epitóp analízis során a két fehérje között tapasztalt különbségek jelentőségét. A köldökzsínór vér IgG anti-Hsp60 tartalma tökéletesen megfelelt az anyai szérum koncentrációjának, ami mérésünk validálása egy részről, másrészt jól megfelel annak a tankönyvi adatnak, hogy az anya IgG-je a placentán átjutva a csecsemő védelmét is szolgálja. Ugyanakkor az anyai IgG antitestek (vagyis az anya immunológiai tapasztalata) részt vehetnek az érésben levő immunrendszer formálásában, kialakításában azáltal, hogy befolyásolják az antigének feldolgozását, prezentációját. Az anyából átjutó antitestek a magzat immunrendszerének „taníthatják”, hogy mely idegen struktúrák ellen kell védekezni. Ugyanakkor a homunkulusz azt is meghatározhatja, hogy az agresszív választ honnan kell távol tartani, vagyis mely saját molekulákat kell kiemelt védelemben részesíteni a perifériás tolerancia által (Cohen, 1991b).

Kazatchkine és Coutinho munkacsoportja foglalkozott először a természetes autoantitest mintázatok és az életkor kapcsolatával. Vizsgálatukhoz kvantitatív immunoblot technikát alkalmaztak, ami lehetővé tette nagyobb esetszámú vizsgálatok kivitelezését. Megállapították, hogy ezek az antitestek kora gyermekkorban jelen vannak már, kiemelkedő homogenitást

mutatnak az egyes emberek között (ugyanazok a molekulák kerülnek felismerésre mindenkién), és az egyedre jellemző minta stabil, nem mutat változást az életkor előrehaladtával. Idős személyekben ugyanazokat az IgM mintázatokat találták, melyeket a csecsemőkben vagy kisgyermekekben tudtak kimutatni (Mouthon, 1996). Hasonló megfigyelést tettek az IgG antitest mintázatokkal kapcsolatban is (Lacroix-Desmazes, 1995). Az élet során kvalitatív és kvantitatív értelemben konzerváltan megőrzött, sajátot felismerő antitest mintázatok igen élesen szemben állnak a bakteriális antigéneket felismerő mintázatokkal. A baktérium extraktumokkal végzett immunoblot analízisek az IgG és IgM mintázatok diverzifikálódását és életkorral változó mennyiségét mutatták (Mouthon, 1996, Lacroix-Desmazes, 1995). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a sajátot felismerő antitestek pozitív szelekció során választódnak ki és őrződnek meg stabilan egészségesekben. Wick és munkatársai a Bruneck vizsgálat résztvevőiben felmérték az anti-Hsp65 antitestek mennyiségét 5 év eltéréssel két alkalommal is. Meglepő módon az anti-Hsp65 antitestek szintje igen stabil, változatlan volt a több mint 800 egészséges személyben (Xu, 1999). A stabilitás azokban is megmutatkozott, akikben carotis atherosclerosis volt kimutatható, és azokban is, akik magas antitestszintekkel rendelkeznek. Ha elfogadjuk a Wick hipotézis premisszáját, hogy bakteriális infekciók vezetnek a keresztreagáló anti-Hsp antitestek keletkezéséhez, akkor nehéz magyarázatot adni arra, miért ilyen stabil egy bakteriális antigénnel szemben az antitestszint 5 év távlatában. Ez az ellentmondás úgy oldható fel, ha kimutatható, hogy az anti-Hsp65 antitestek jelentős része nem a bakteriális infekciókkal mutat szoros összefüggést, hanem pozitív szelekcióval kiemelten őrződik meg a természetes antitest repertoárban. Ebben az esetben a személyek között eltérő mennyiségben kimutatható anti-Hsp60 autoantitestek koncentrációja változatlan hosszú időn keresztül. Ezt a feltevést az egészséges brit férfiak mintáinak segítségével vizsgáltuk.

A Northwick Park Heart vizsgálatba bevont egészséges brit férfiktól 3 alkalommal történt mintavétel, és feljegyzésre kerültek a megbetegedési adatok. Lehetőségünk nyílt olyan vizsgálati személyek mintáit analizálni anti-Hsp60 autoantitestek jelenlétére, akik egészségesek maradtak az ötéves követés során. Eredményeink alátámasztották a fent megvilágított hipotézisünket. Az egészséges személyek IgG anti-Hsp60 autoantitestjei jellegzetes, log-normál eloszlást mutattak, és szintjük nem változott jelentősen 5 év távlatában. Azok a személyek, akik kevés vagy sok antitesttel rendelkeztek a vizsgálatba való bevonáskor, öt év múlva is hasonló jellegzetességet mutattak. Ezek az eredményekből egészséges populációban is megerősítették, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek a természetes antitestek közé tartozhatnak.

Kazatchkine és Coutinho munkacsoportja az autoimmun betegségek keletkezésével kapcsolatos elméletét eredményei alapján az alábbiakban foglalta össze (Lacroix-Desmazes, 1998). Kétféle úton keletkezhet autoimmun betegség: (i) ha egy saját antigén fiziko-kémiai változáson megy keresztül vagy abnormális helyen expresszálódik, lehetőséget teremt az autoreaktív, autológ T- és B-sejtek oligoklonális szaporodására. Ez a folyamat autoantitestek keletkezéséhez vezethet, melyek tulajdonságaikban leginkább az „immun” antitestekre hasonlítanak (magas affinitás, specificitás). (ii) Azonban ha a szervezet autoreaktivitás-homeosztázisát biztosító immunhálózat elsődlegesen (genetikailag), másodlagosan (fertőzések által) vagy ezek kombinációjaként felépítésében ill. működésében károsodik, szintén autoimmun betegség keletkezhet. Erre az állapotra olyan autoantitestek felszaporodása lehet jellemző, melyek akár a természetes antitestek (alacsony affinitás, polireaktivitás), akár az „immun” antitestek jellegzetességeivel is bírhatnak.

Egy adott autoimmun (autoantitestekkel jellemezhető) folyamat során kiemelt fontosságú az alapfolyamatok tisztázása. Ha abból indulunk ki, hogy az atherosclerosis etiopatogenezisében fontos szerepet játszanak az anti-Hsp60 autoantitestek, akkor eredményeink alapvetően fontosak a terápiás stratégiák kiválasztása szempontjából. A jelen fejezetben összefoglalt adatok alátámasztják hipotézisünket az anti-Hsp60 autoantitestek természetes antitestek közé tartozásáról. Ebben az esetben indokolt újszerű terápiás megfontolásokhoz nyúlni az atherosclerosis vonatkozásában is. Ilyen próbálkozások közé egyaránt tartozhat aktív (reguláló immunválasz keltése az autoantigén ellen, az adjuváns arthritis modell analógiájára [van Eden, 2005]) vagy passzív (intravénás immunglobulin terápia a reguláló antitestek szintjének helyreállítására) terápiás modalitás.

A további munkahipotézis kifejtése

A természetes antitestek hálózata elsődleges (genetikai) és másodlagos (környezeti) okok kombinációjaként változhat. Munkánk fókuszába a továbbiakban ez a két tényező került. Kísérleteink célja az volt, hogy felderítsük, mely genetikai és környezeti (fertőző) tényezők állnak kapcsolatban alacsony vagy magas anti-Hsp60 autoantitestszintekkel. A kérdés vizsgálatához komplex klinikai vizsgálataink teremtettek lehetőséget, ugyanis rendelkezünk betegeinktől DNS analízisre és szerológiai vizsgálatokra is alkalmas mintákkal.

3, Az anti-Hsp60 autoantitestek szintjét befolyásoló tényezők vizsgálata

Bevezetés

Az anti-Hsp60 autoantitestek jellegzetességeit komplex klinikai vizsgálatok során tanulmányoztuk. Elsődleges célunk az volt, hogy az adott betegség fennállása, jellegzetességei és az antitestek szintje között összefüggést keressünk. Vizsgálatainkat ezért eset-kontroll felépítésűnek terveztük. Minden vizsgálatban különös hangsúlyt fektettünk arra, hogy a lehető legtöbb klinikai paraméter rögzítésre és feldolgozásra kerüljön, továbbá ugyanazon betegmintákban igyekeztünk több mérést kivitelezni (további autoantitestek, fertőzések szerológiai markerei, akut-fázis reaktánsok, genetikai polimorfizmusok). A 8. táblázat mutatja a nem kardiovaszkuláris beteganyagon végzett, a Hsp60 autoantitestek megismerését célzó saját vizsgálataink összefoglalását (a kardiovaszkuláris beteganyagon végzett saját munkák áttekintését ld. a 4. táblázatban, 34. oldal).

Vizsgálataink során két kardiovaszkuláris betegséggel (koronária betegség és stroke, vizsgált betegek/kontrollok száma 1101/949), egy fertőző betegséggel (HIV-fertőzés 74/217) és autoimmun patomechanizmusú, szisztémás betegségekkel foglalkoztunk (I. tip. diabetes mellitus, szisztémás lupus erythematosus, nem-differenciált kötőszöveti betegség, primér Raynaud szindróma, szisztémás sclerosis, rheumatoid arthritis, dermatomyositis/polymyositis, gyulladásos bélbetegség; vizsgált betegek/kontrollok száma 1276/934). Ezekben a további vizsgálatokban kapott eredményeink megerősítik korábbi nézetünket, hogy lényeges különbségek tapasztalhatók az anti-Hsp60 autoantitestek és az anti-Hsp65 antitestek között. A diabetes mellitusos gyermekekben tett megfigyeléseink megerősítették, hogy a többféle epitóp specifitású anti-Hsp60 autoantitest „keveréken” belül két csoport között kimutathatók lényeges eltolódások akkor is, ha a két csoportban mért teljes IgG anti-Hsp60 autoantitestszintek azonosak. Más szavakkal létezhetnek „patogén epitópok”, melyek ellen szelektíven keletkezhetnek antitestek (és feltehetően sejtes immunválasz is). A p277 (9. epitóp)-ellenes proinflammatorikus immunválasz kioltásának, lecsendesítésének jelentős klinikai haszna mutatkozott egy klinikai vizsgálatban (Raz, 2001), így azok a vizsgálatok, melyek az anti-Hsp immunválasz regulációját epitóp szinten tanulmányozzák, lényeges új információval szolgálhatnak a jövőben.

8. táblázat: Az anti-Hsp60 autoantitestek szintjét befolyásoló tényezők megismerésére szervezett saját vizsgálataink áttekintése

Betegség	Vizsgáltak száma (beteg/kontroll)	Összefüggés	Megjegyzés	Referencia
HIV-fertőzés	74/217 132/140	Az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 szintek nem emelkedtek HIV-fertőzöttekben. Az anti-Hsp antitestek korrelációt mutatnak az anti-C1q autoantitestekkel.	Az anti-Hsp antitestek szintje csökken a betegség előrehaladtával. A két antitest között keresztreakció is kimutatható.	V. VII.
Diabetes mellitus I. típ.	83/81	Az anti-Hsp60 autoantitestek nem emelkedtek, az anti-p277 (9. epitóp az 5. ábrán) antitestszintek emelkedtek diabetesben.	Még egy további epitóp (8. epitóp az 5. ábrán) ellen mutathatóak ki antitestek emelkedett mennyiségben diabetesben.	XI.
Szisztémás autoimmun betegségek	272/192 198/349	Emelkedett anti-Hsp antitestszintek szisztémás sclerosisban és nem differenciált kötőszöveti betegségben. Az anti-Hsp65 IgG-szintek kapcsolatot mutatnak az anti- <i>H. pylori</i> IgG antitestekkel, míg az anti-Hsp60 autoantitestek nem.	Az anti-Hsp65 antitestek nem differenciált kötőszöveti betegségben szenvedőkben keresztreakciót és korrelációt mutatnak az anti-C1q antitestekkel. A legmagasabb <i>H. pylori</i> szeroprevalencia a szisztémás sclerosis és nem-differenciált kötőszöveti betegek csoportjában mutatkozott.	VI. XII.
Gyulladásos bélbetegség	66/126 124/110	Mindkét vizsgálatban csökkent anti-bakteriális Hsp65/GroEL antitestszintek a betegekben, az anti-Hsp60 autoantitestek nem mutatnak kapcsolatot.	A kapcsolat a Crohn-betegségben szenvedőkben erősebbnek mutatkozik, mint colitis ulcerosaban.	XIII. XIV.
Egészséges finn véradó férfiak	176	Kapcsolat az IL-6 -174 promóter polimorfizmussal. Kapcsolat az immunglobulin GM allotípus determinánssal. Episztatikus kölcsönhatás az IL-6 és Ig GM gének között.		XV. XVI. XVI.
Egészséges magyar személyek	327	Kapcsolat az IL-6 -174 promóter polimorfizmussal.		Közlés előtt

A szisztémás autoimmun betegségekkel kapcsolatban azt tapasztaltuk, hogy az anti-Hsp65 antitestválasz szoros összefüggést mutat egyes átélt vagy perzisztáló infekciókkal, míg az anti-Hsp60 IgG vonatkozásában az infekciók szerepe másodlagos. Ez a megfigyelés pontosan megegyezik a koronária betegekben kapott eredményeinkkel. Az infekciók és az anti-Hsp65 antitestek potenciális összefüggése arra sarkallt bennünket, hogy ezt a kérdést alaposabb vizsgálatnak vessük alá.

Szintén külön vizsgálatsorozatot terveztünk abból a célból, hogy genetikai tényezőket azonosítsunk, melyek a természetes autoantitest repertoár nagyságát (az immunológiai

homunkulusz „méretét”) szabályozhatják. Az anti-Hsp60 IgG antitestek ideális modellnek tűntek vizsgálatainkhoz, mivel jelentős mennyiségű idevágó adattal rendelkezünk. A következő két alfejezetben a fertőzések és egyes genetikai tényezők anti-Hsp antitestekkel mutatott kapcsolatának elemzése következik.

Fertőzőes tényezők és az anti-Hsp antitestszintek kapcsolata

A súlyos koronária betegségben szenvedőkben (saját beteganyag) három fertőzés, a *Chlamydia pneumoniae*, a *Helicobacter pylori* és a cytomegalovírus jelenlétét vizsgáltuk. Mindhárom kórokozó esetében az IgG szeroprevalenciát határoztuk meg, ami átélt infekciót jelez. A HOPE vizsgálat keretén belül kardiovaszkuláris szempontból nagy rizikójú személyek mintáit vizsgáltuk *Chlamydia* IgG és IgA (ez utóbbi a perzisztáló infekció jele) valamint CMV IgG antitestek jelenlétére nézve. A *H. pylori* IgG jelenlétét a szisztémás autoimmun- és a súlyos koronária betegek csoportjában is felmértük. A különféle, lezajlott vagy perzisztáló infekciót jelző antitestek szintjét összevetettük a mintákban szintén megmért anti-Hsp antitestszintekkel. Az eredmények összesítését a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat: Korreláció egyes fertőző betegségek szerológiai jelei és az anti-Hsp60 antitestszintek között saját vizsgálatainkban

Betegcsoport/infekció	Esetszám	Anti-Hsp60 IgG	Anti-Hsp65 IgG	Referencia
		Korrelációs együttható (p)		
Szisztémás autoimmun betegek/ <i>H. pylori</i> IgG	198	0,056 (0,441)	0,335 (<0,0001)	XII.
Koronária betegek/ <i>H. pylori</i> IgG	357	-0,047 (0,376)	0,18 (0,001)	I.
Koronária betegek/ <i>C. pneumoniae</i> IgG	248	0,1 (0,21)	0,024 (0,776)	XVII.
HOPE*/ <i>C. pneumoniae</i> IgG	671	0,00 (>0,05)	0,02 (>0,05)	IX.
HOPE/ <i>C. pneumoniae</i> IgA	671	-0,01 (>0,05)	-0,01 (>0,05)	IX.
Koronária betegek/ CMV IgG	248	-0,015 (0,843)	-0,041 (0,628)	XVII.
HOPE/ CMV IgG	666	-0,02 (>0,05)	0,04 (>0,05)	IX.

*A HOPE vizsgálat résztvevői koronária események szempontjából magas rizikójú személyek voltak. A szerológiai paraméterek meghatározása a hivatkozott cikkekben leírtaknak megfelelően történt.

Az eredményekből látszik, hogy a *H. pylori* IgG és anti-Hsp65 IgG korrelációtól eltekintve egyetlen kórokozó elleni antitest és Hsp60 vagy Hsp65 antitest vonatkozásában sem sikerült összefüggést kimutatnunk. Ez feltehetően arra utal, hogy csak krónikus, a szervezetet kolonizáló bakteriális infekciók képesek jelentős mértékben a bakteriális, immundomináns Hsp65 ellen antitesttermelés beindítására. Ezek az antitestek nagy valószínűséggel a fertőzéssel szemben protektív antitestek.

A *Chlamydia* infekció és az anti-Hsp szintek vonatkozásában azt tapasztaltuk, hogy nincs direkt összefüggés a két tényező között (XVII., 3. táblázat). A *C. pneumoniae* szeropozitivitás független rizikófaktor volt vizsgálatunkban a súlyos koronária betegségnek, csakúgy, mint az anti-Hsp60 autoantitestek. Kiemelendő, hogy a két tényező kapcsolata összeadódó volt, vagyis a *C. pneumoniae* szeropozitív és emelkedett anti-Hsp60 autoantitestet hordozó személyek esélye volt a legnagyobb arra, hogy koronária betegségük legyen (XVII. 5. táblázat). A CMV szeropozitivitás nem volt független kapcsolatban a koronária betegséggel, és a Hsp60 autoantitestekkel sem volt összeadódó hatása.

Genetikai tényezők és az anti-Hsp antitestszintek kapcsolata

A továbbiakban a Hsp60 autoantitestszintek és egyes citokin gén polimorfizmusok összefüggéseit vizsgáltuk, melyre Mikko Hurme professzor úrral (University of Tampere, Finnország) indított kollaborációs munkánk adott lehetőséget. Mind pro-, mind anti-inflammatorikus citokineket tanulmányoztunk, eredményeinket a melléklet XV. [cikke](#) mutatja be. Az antitesttermelés és B-sejt proliferáció alapvető szabályozói a citokinek, ezek között is igen fontos az interleukin 6 (IL-6), melyet eredetileg mint B-sejt növekedési faktort írtak le (Hirano, 1986). Vizsgálatunkat megpróbáltuk úgy felépíteni, hogy ne egy kiragadott citokint, hanem annak lehetséges „környezetét”, kapcsolatait is vizsgáljuk. Ezzel a stratégiával végül is az IL-1-alfa -511, IL-1-béta -889, az IL-6 -174 és az IL-10 -1082, -819, -592 és az IL-1 receptor antagonist (RA) polimorfizmusokat vizsgáltuk 173 középkorú, finn férfi véradó mintáiban. Ugyanezeketől a személyektől szérumminta is rendelkezésünkre állt, melyekben az anti-Hsp60 autoantitest méréseket is elvégeztük. Az alkalmazott metodikák részletes leírása a [XV. cikkben](#) található.

Eredményeink szerint erős kapcsolat mutatható ki az IL-6 -174 G>C polimorfizmus és az anti-Hsp60 IgG-szintek között. A legmagasabb antitestszint a vad allélt (G) homozigóta formában hordozó személyekben mutatkozott, a heterozigóta vagy csak ritka allélt hordozókban egyaránt szignifikánsan alacsonyabb antitestszinteket találtunk ([XV. cikk](#), 1. táblázat). További fontos megfigyelésünk volt, hogy az egészséges véradókban a nyugalmi szérum IL-6-szintek és az IL-6 -174 polimorfizmus között nem volt kapcsolat, továbbá az antitestszintek nem mutattak összefüggést az IL-6 koncentrációkkal.

A többi vizsgált citokin esetében nem tudtunk szignifikáns kapcsolatot kimutatni az autoantitest koncentrációkkal akkor sem, ha együttes kiértékelésnek (allélikus variációk szimultán hordozása) vetettük alá adatainkat.

A finn véradók mintáival tett megfigyeléseinket meg kívántuk erősíteni egy független vizsgálatban is. Erre 2005-ben kerülhetett sor, amikor egészséges magyar férfiak és nők DNS és szérum mintáival végezhattük el a fenti mérőssorozatot. Vizsgálatunkba 320 egészséges, foglalkozás egészségügyi szűrővizsgálaton megjelent személy vett részt tájékozott beleegyezést követően. Vizsgálatunk során az IL-6 genotípus meghatározás és az antitestszint mérések a korábban is alkalmazott metodikák szerint történtek. A 10. táblázat a genotípus megoszlásokat mutatja a finn és a magyar populációkban. A magyar populációban egyaránt rendelkezésünkre álltak minták nőktől és férfiaktól is, ezért a genetikai adatok értelmezéséhez beszereztük finn nők IL-6 -174 polimorfizmus adatait is. Megállapítható, hogy az IL-6 -174 polimorfizmus előfordulásában szignifikáns különbség mutatkozik a finn és a magyar populációk között. Az egészséges magyar népesség körében a vad, G allél előfordulása gyakoribb, mint a finn populációban, ez a különbség nők esetében kifejezettebb, mint férfiakban.

10. táblázat: Az interleukin 6 -174 promóter polimorfizmus megoszlása egészséges magyar és finn populációban

Genotípus	Magyar nők, n=203	Magyar férfiak, n=124	Magyar összesen, n=327	Finn nők, n=182	Finn férfiak, n=173	Finn összesen, n=355
IL-6 -174 GG	73 (0,359)	39 (0,314)	112 (0,342)	46 (0,253)	39 (0,225)	85 (0,239)
IL-6 -174 GC	91 (0,448)	56 (0,451)	147 (0,449)	85 (0,467)	84 (0,485)	169 (0,476)
IL-6 -174 CC	39 (0,193)	29 (0,235)	68 (0,209)	51 (0,280)	50 (0,290)	101 (0,285)
IL-6 -174 G allél frekvencia	0,583	0,541	0,567	0,486	0,468	0,477
IL-6 -174 C allél frekvencia	0,417	0,459	0,433	0,514	0,532	0,523

p= 0,0024 (magyar nő vs. finn nő); 0,203 (magyar férfi vs. finn férfi); 0,005 (magyar vs. finn)

Az anti-Hsp60 autoantitestszintek IL-6 -174 genotípus szerinti bemutatása a 11. táblázatban található. A magyar populációban is sikerült kimutatni az IL-6 polimorfizmus és az anti-Hsp60 autoantitestek közötti kapcsolatot. A legmagasabb antitestszintet ebben a csoportban a GC heterozigóták esetében mértük, velük csaknem azonos koncentrációkat találtunk a GG homozigótákban. A legalacsonyabb autoantitestszint a magyar populációban is, hasonlóan a finnországihoz, a CC genotípust hordozókban volt. Férfiakban az antitestszintek megoszlása hasonló volt a teljes vizsgálati csoportéhoz, míg nők esetében a legmagasabb autoantitestszintet a GG genotípust hordozókban találtuk. Az IL-6 genotípus és nem szerint felbontott csoportok között nincs szignifikáns különbség az antitestszintek vonatkozásában (p=0,402). A G allélt hordozó személyeket a teljes csoportban (vagy nemek szerint külön analizálva is) szignifikánsan magasabb anti-Hsp60 autoantitestszint jellemezte. Az anti-Hsp65

antitestek szintje, hasonlóan az anti-Hsp60 autoantitestekhez, szignifikáns összefüggést mutatott az IL-6 genotípusokkal (az adatok nincsenek bemutatva).

11. táblázat: Az anti-Hsp60 autoantitestszintek IL-6 -174 genotípus szerinti megoszlása egészséges magyar populációban

Genotípus	Összes személy, n=320		Férfiak, n=118		Nők, n=202	
	Anti-Hsp60 IgG	p	Anti-Hsp60 IgG	p	Anti-Hsp60 IgG	p
IL-6 -174 GG	41,8 (23,3-82,1)	0,0026	37,5 (24,5-53,9)	0,0343	48,2 (23,6-112,9)	0,064
IL-6 -174 GC	46,4 (29,8-77,9)		44,9 (28,4-77,1)		47,6 (31,7-79,6)	
IL-6 -174 CC	30,0 (18,6-50,0)		27,7 (16,8-43,9)		38,6 (19,8-51,8)	
IL-6 -174 G hordozó	44,9 (28,4-78,8)	0,0013*	40,5 (27,4-69,6)	0,018	48,1 (28,7-88,2)	0,022

* IL-6 -174 GG+GC vs. CC

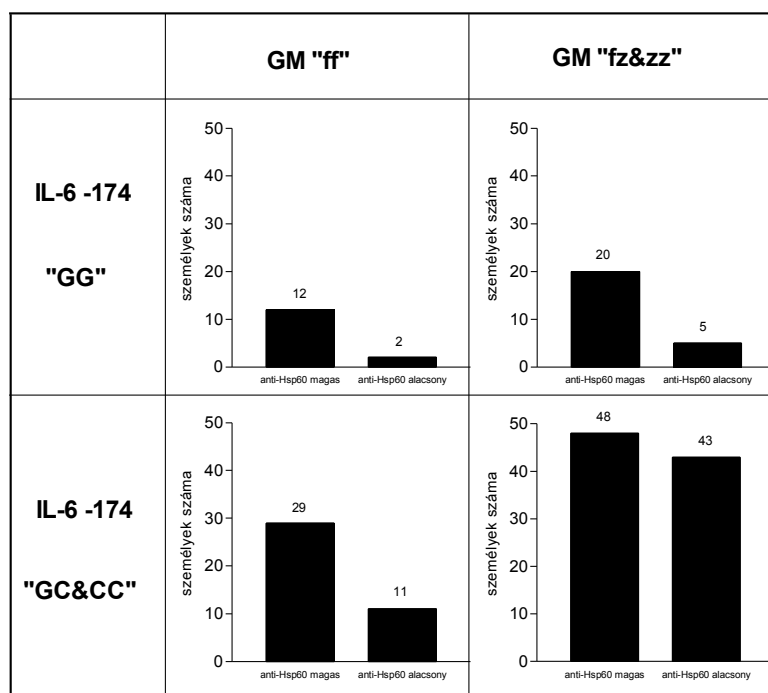
A 173 finn véradó mintájának vizsgálatát más genetikai jellegekre is kiterjesztettük. Újabb méréseink az immunglobulin nehéz és könnyű láncok konstans régió (GM és KM) polimorfizmusainak vizsgálatát célozták. Ez a munka is kollaboráció keretein belül született, a GM és KM allotipizálást Janardan P. Pandey végezte (Medical University of South Caroline, Charleston, SC, USA), a metodika a melléklet XVI. cikkében és az ott hivatkozott munkákban részletesen leírva megtalálható. Az immunglobulin GM és KM gének az immunglobulin láncok olyan antigén determinánsait kódolják, melyeket immunglobulin allotípusoknak szoktak nevezni. Az Ig allotípusok megoszlása az emberi rasszok között igen változó, azonban egy rasszon belül bizonyos allotípusok előfordulása és megőrzöttsége meglepően állandó. Ez arra utal, hogy az antitestek allotípusának kialakításában és a polimorfizmusok fennmaradásában különféle szelekciós tényezők vehettek részt az evolúció során. Az egyik ilyen szelekciós tényező nagy valószínűséggel a különféle infekciók jelenléte lehetett, ami az eltérő humorális immunválaszon keresztül befolyásolhatta a populáció allélikus jellemzőit. Korábbi munkák ismertek, melyekben az immunglobulin allotípusok megoszlása és az oltásokra adott immunválasz erőssége között mutattak ki kapcsolatot (Pandey, 2001). Ezért ezzel a vizsgálattal az volt a célunk, hogy megállapítsuk, van-e kapcsolat az immunglobulin allotípusok és az anti-Hsp60 autoantitestszintek között.

A XVI. cikkben bemutatott eredmények (1. táblázat) szerint szignifikáns kapcsolatot tudtunk kimutatni az Ig GM f, z allélek és az anti-Hsp60 autoantitestszintek között. A GM lókuszon z allélt hordozó személyekben kb. 33%-kal alacsonyabb autoantitestszinteket mértünk, mint a z allélt nem hordozókban. Hasonló összefüggés az anti-Hsp65 antitestek vonatkozásában nem mutatkozott. Az Ig GM (b, g) és KM (1, 3) allotípusok nem mutattak összefüggést egyik vizsgált antitesttel sem.

Episztatikus kölcsönhatások és autoantitest reguláció

Az atherosclerosis patogenezisével kapcsolatos vizsgálataink során két esetben is azt tapasztaltuk, hogy genetikai és környezeti tényezők közötti kölcsönhatások szabályozhatnak bizonyos folyamatokat. Az egyik példa esetében a magas anti-Hsp60 autoantitestszintek és a *Chlamydia pneumoniae* IgG pozitivitás összeadódó hatását észleltük a koronária betegség vonatkozásában (XVII.), míg másik vizsgálatunkban a mannóz-kötő fehérje genetikai deficienciája és a *Chlamydia* infekció között észleltünk interakciót (XVIII.). Ezek a megfigyelések arra ösztönöztek bennünket, hogy fektessünk hangsúlyt az egyes biológiai tényezők független, fő hatásainak vizsgálata mellett a tényezők közötti kölcsönhatásokból származó effektusok vizsgálatára is. A populációs genetikai vizsgálatokban a kölcsönhatásokból származó hatások vizsgálata régóta ismert, mely ismereteket ma modern adatfeldolgozási eljárásokkal házasítva új jellegű információkhoz juthatunk. Immunglobulin allotípus eredményeinket a fenti megfontolások alapján a továbbiakban a rendelkezésünkre álló IL-6 polimorfizmus adatokkal összefüggésben is elemeztük. Célunk annak vizsgálata volt, hogy az antitestválaszt befolyásoló két genetikai tényező között ki tudunk-e mutatni biológiai kölcsönhatást. Fontos hangsúlyozni, hogy a kölcsönhatás felderítését szolgáló stratégia felállítását ebben az esetben előzetes hipotézis és eredmények segítették. Az analízist az tette lehetővé, hogy ugyanabban a populációban (finn véradó férfiak) rendelkezésünkre álltak a genetikai adatok mellett az autoantitest mérések eredményei is.

Amint az a 12. ábrán látható, az IL-6 és Ig GM genotípus adatok szerint csoportosított anti-Hsp60 autoantitestszintek lényeges különbségeket mutatnak az egyes alcsoportok között. Az IL-6 és GM allélek közötti kölcsönhatások jelentősen befolyásolták az antitestek mennyiségét. A legalacsonyabb antitestszint az IL-6 -174 C és GM z alléleket hordozó személyekben volt. Azok, akik IL-6 -174 GG genotípust hordoztak, függetlenül attól, hogy milyen allélek voltak jelen a GM lókuszon, szignifikánsan magasabb anti-Hsp60 autoantitestszinttel rendelkeztek. Viszont akik a GM f, f allotípusokkal voltak jellemezhetőek, csak akkor hordoztak anti-Hsp60 autoantitestet magasabb koncentrációban, mint a z, z & z, f csoport, ha az IL-6 -174 pozícióban C allélt hordoztak.



12. ábra: Az anti-Hsp60 autoantitestszintek elemzése az interleukin 6 -174 promóter G>C polimorfizmus és az immunglobulin GM f/z allélek hordozása szerint. Az alacsony anti-Hsp60 autoantitestszint határértéke a teljes csoport (finn véradó férfiak, n=173) 33. percentilise volt (≤ 17.66 AU/ml).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IL-6 gén promóter polimorfizmus és az Ig GM allotípus közötti kölcsönhatás szignifikáns, episztatikus kölcsönhatásban áll az anti-Hsp60 autoantitestek mennyiségével. Más szavakkal, a GM f, f allotípus és a magas anti-Hsp60 IgG kapcsolatot az IL-6 -174 C allél jelenléte képes elfedni (12. [táblázat](#)). Egyik lókuszt autoantitestszintekre kifejtett hatása csak egy másik lókuszt bizonyos alléljának jelenléte mellett érvényesül.

12. táblázat: Az anti-Hsp60 autoantitestszintek elemzése az interleukin 6 -174 promóter G>C polimorfizmus és az immunglobulin GM f/z allélek hordozása szerint.

Genotípus	Anti-Hsp60 magas (n)	Anti-Hsp60 alacsony (n)	Anti-Hsp60 (AU/ml)
IL-6-174-C&GM-zz v. fz	48	43	21.3 (12.3-39.6)
IL-6-174-C&GM-ff	29	11	29.8 (15.7-72.4)
IL-6-174-GG&GM-zz v. fz	20	5	36.6 (20.8-79.0)*
IL-6-174-GG&GM-ff	12	2	55.6 (25.4-75.4)*
	khi-négyzet próba (trend): p=0.0009		p=0.002

Az alacsony anti-Hsp60 autoantitestszint határértéke a teljes csoport (finn véradó férfiak, n=173) 33. percentilise volt (≤ 17.66 AU/ml). *p<0.05 az ANOVA poszt-tesztje során, az IL-6-C/GM zz&FZ csoporthoz viszonyítva.

Meg kell jegyezni, hogy az összes vizsgált allél eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg szabálynak.

Az anti-Hsp65 antitestek szintje is szignifikáns összefüggést mutatott az IL-6 és GM genotípusokkal, amennyiben az analízis a két gén közötti episztázis felderítésének lehetőségét is magában hordozta (ld. XVI. cikk, 2. táblázat).

Megbeszélés

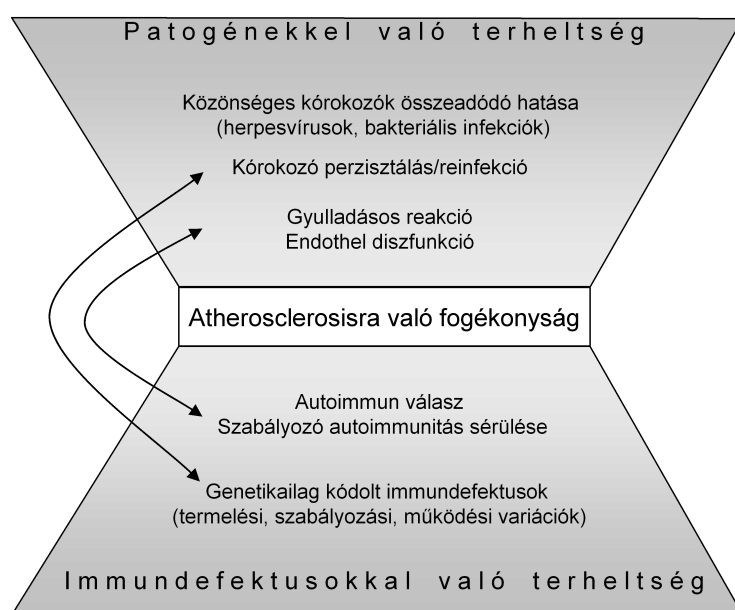
Az ebben a fejezetben bemutatott vizsgálatainkkal arra kerestünk választ, hogy milyen tényezők befolyásolhatják az anti-Hsp60 autoantitestek szintjét egészségesekben és különféle betegségben szenvedőkben. A Hsp60 család tagjai infekciókban immundomináns antigénként viselkednek, így ellenük antitestek keletkeznek, melyek hosszú ideig kimutathatók a keringésben. Először különféle infekciók tanulmányozását végeztük el érbetegekben és autoimmun betegségben szenvedőkben. További célunk volt autoantitestszintekkel kapcsolatban álló genetikai tényezők azonosítása. Két csoportba (citokinek és immunglobulin) tartozó géneket vizsgáltunk, ezekről kézenfekvő feltételezni, hogy kapcsolatot mutathatnak antitestszintekkel. Vizsgálataink eredményei figyelmünket a különböző tényezők közötti kölcsönhatásokra irányították, így ennek a területnek különös hangsúlyt adtunk.

Az anti-Hsp60 autoantitestek szintjét a fertőzések nagymértékben befolyásolhatják, mivel a hősokkfehérjék igen konzervált molekulák, és immundomináns jellegűek az infekció során. Tekintettel arra, hogy az atheroscleroticus érbetegségben szenvedőkkel kapcsolatban halmozódott fel a legtöbb erre vonatkozó adat, először ezek ismertetése következik.

A fertőzések szerepe az atherosclerosis etiopatogenezisében

A fertőzések szerepe ma még nem tekinthető tisztázottnak az atherosclerosis patogenezisében. Ellentmondásos eredmények jelentek meg az irodalomban az egyes fertőző ágensek szerepére vonatkozóan. Epstein és munkatársainak jelenlegi elképzelése szerint inkább több, gyakori patogén együttesen, mint önmagában egy vagy két adott kórokozó fokozza a koronária betegség kockázatát. Eredményeik szerint (Prasad, 2002) a koronária betegek 96%-a három vagy több közösleges kórokozóval szemben szeropozitív. A szerzők a „*patogénnel való terheltség*” kifejezéssel szemléltetik azt a tényt, miszerint az élet során elszenvedett számos fertőzés együttes hatása a koszorúér-betegség fontos és független előrejelzője. Az elméletet további, független vizsgálatok megfigyelései is alátámasztják (Smieja, 2003, Rupprecht, 2001). Bár elég érdekes és meggyőző módon, a patogénnel való terheltség teória a

gazdaszervezet és a patogén közötti kölcsönhatásokat a kórokozó szemszögéből közelíti meg. Az atherosclerosis patogenezisében a gyulladásos-immunológiai tényezők szerepét is igyekeztük vizsgálataink során figyelembe venni. A komplex kísérlettervezés (antitest és genetikai vizsgálatok) lehetővé tette számunkra a patogénekkal való terheltség teória mintájára az „*immundefektusokkal való terheltség*” kifejezés bevezetését. A környezeti tényezők (mint például a patogének) figyelembe vételén kívül elméletünk (13. [ábra](#)) behatóbban foglalkozik azzal a ténnyel, miszerint az adott személyben a környezeti és biológiai kockázati tényezők összes hatása egyben jelenik meg, és az egyén genetikai- és immunológiai „hátszaga” alapvetően befolyásolja a veszélyes behatások nettó eredményét (XIX, XX).



13. ábra: A patogénekkal való terheltség, az immundefektusokkal való terheltség és az atherosclerosisra való fogékonyság kapcsolata.

Elméletünket alátámasztó eredményeink szerint a *C. pneumoniae*-vel szembeni szeropozitivitás mérsékelt összefüggést mutatott a koronária betegség fennállásával, ez az összefüggés sokkal erősebb volt azokban, akik az *mb12* gén hibás variánsát hordozták (XVIII.). Másként kifejezve a *Chlamydia* fertőzés olyan, genetikailag fogékony személyekben eredményezheti koronária betegség kifejlődését, akik egy bizonyos „enyhe” immundefektust hordoznak. Nem találtuk szignifikánsan emelkedettnek az *mb12*-variáns allél hordozókban a C-reaktív fehérje koncentrációt, ami arra utal, hogy az MBL hiány önmagában nem oka a krónikus, alacsony szintű gyulladásnak ebben a betegcsoportban. Ehhez hasonlóan az *mb12*-variáns allél nem mutatott kapcsolatot az anti-Hsp60 antitestek koncentrációjával sem. Az atherosclerosis keletkezésével kapcsolatban egy további, a humán TLR4-es receptort kódoló

gén hibás működését is leírták újabban (Kiechl, 2002). A szerzők beszámoltak arról, hogy a csökkent NF- κ B aktivációt okozó TLR4299 allél jelenléte csökkentette a carotis atherosclerosis kialakulásának valószínűségét. Ez arra utal, hogy a TLR4 esetében nem a kórokozókkal szemben megváltozó fogékonyság, hanem egy esetlegesen (pl. fertőzés hatására) kialakuló gyulladásos reakció természete, erőssége határozza meg az atherosclerosis-sal való összefüggést. Mindazonáltal az eredmények arra utalnak, hogy a kórokozók felismerése a természetes immunitás által fontos szerepet tölt be az atherosclerosis patogenezisében. Az infekciókkal szembeni fogékonyságot szabályozó tényezők áttételesen hatással lehetnek az anti-Hsp60 antitestválaszra is, bár erre ma még nincs konkrét bizonyíték. A fentiekben ismertetett eredmények és hipotézisek arra utalnak, hogy a krónikus bakteriális infekciók, és a bakteriális Hsp65 elleni antitestek emelkedett szintjei között kapcsolat lehet, ami fokozottan mutatható ki különféle érbetegségekben szenvedőkben. Az élet során elszenvedett, hatásukban összeadódó, akut vagy perzisztáló bakteriális fertőzések, melyek gyakran egyéb környezeti (dohányzás) vagy genetikai (pl. természetes immunitás) tényezőkkel szoros kapcsolatban állnak, az anti-Hsp65 antitestek mennyiségének módosítása által is hatással lehetnek az atherosclerosis kialakulására, előrehaladására. Ezek, a külön-külön is rizikónövelő, független tényezők hatásukban összeadódó jellegűek.

Fertőzéses tényezők és az anti-Hsp antitestek kapcsolata

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az anti-Hsp65 antitestek a *H. pylori* infekcióval mutatják a legszorosabb kapcsolatot. Erre vonatkozóan konkrét irodalmi adatok is ismertek. Több, japán, ulcus betegségben szenvedő betegen végzett vizsgálat is kapcsolatot mutatott ki a *H. pylori* infekció és az emelkedett anti-Hsp65 antitestszintek között, a *H. pylori* eradikációs kezelését követően az anti-Hsp65 antitestek szintje szignifikánsan csökkent (Takenaka, 2004), mely csökkenés a terápia sikerének monitorozására is felhasználható volt (Yunoki, 2000). Ezzel összhangban a keresztreakáló epitópokkal szemben hiányzó anti-Hsp65 antitest válasz klinikailag manifest *H. pylori* infekciót kísért (Yamaguchi, 2000).

Eredményeink megfelelnek az irodalomban ismert, kardiovaszkuláris betegségben szenvedőkön tett megfigyeléseknek is. A *H. pylori* szeropozitivitás és az atherosclerosis között azonban csak az alacsony szociális státusszal rendelkezőkben mutatható ki kapcsolat (Mayr, 2000). A kapcsolat még erősebb azokban, akik a citotoxicitás-asszociált A gén (CagA) ellen is tartalmaznak antitesteket, tehát patogénebb baktériumtörzsszel fertőzöttek (Mayr, 2003). Ebben a vizsgálatban az anti-Hsp65 IgG-szintek egyértelmű kapcsolatot mutattak a *H. pylori* IgG-szintekkel, különösen az alacsony szociális státusszal rendelkezőkben, továbbá

krónikus légúti betegségek (bronchitis chronica, emphysema és asthma bronchiale) és a magas anti-Hsp65 IgG-szintek kapcsolatát is megfigyelték. A *H. pylori* és az anti-Hsp65 antitestek kapcsolatát koronária betegségben is leírták. Birnie és mtsai (1998) angiográfiával igazolt betegség esetén a *H. pylori* IgG és anti-Hsp65 IgG között szignifikáns, pozitív korrelációt ($r=0,39$, $p<0,0001$) tapasztaltak. A *H. pylori* pozitívítás vizsgálatában a dohányzással, alacsony szociális státusszal és a fibrinogénszintekkel mutatott összefüggést. Mindezen tényezőkre történt adjusztálás után a Hsp65 IgG antitestek nem mutattak szignifikáns kapcsolatot a koronária betegséggel. Ezzel az eredménnyel teljesen összhangban van Rothenbacher és munkatársainak az a megfigyelése (Rothenbacher, 2001), hogy angiográfiával igazolt koronária betegekben a *H. pylori* IgG pozitívítás, az anti-*H. pylori* Hsp60 IgG antitestek és az alacsony iskolázottság egymással kapcsolatot mutatnak. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a krónikus bakteriális infekciók, és a bakteriális Hsp65 elleni antitestek emelkedett szintjei között kapcsolat lehet, ami fokozottan mutatható ki különféle érbetegségben szenvedőkben.

A *Chlamydia* infekció szerológiai jelei és az anti-Hsp60 antitestek közötti összefüggéssel kapcsolatban egybehangzóak az irodalomban található eredmények: a kettő között nem mutatható ki korreláció (Mayr, 2000). A Bruneck vizsgálat eredményei szerint a *C. pneumoniae* IgA szeropozitívitas összefüggésbe hozható a carotis atherosclerosis fennállásával, különösen akkor, ha erős gyulladásos reakció (magas CRP-szint) is kimutatható az érintettekben (Mayr, 2000). Ugyanakkor saját vizsgálatunkban (XVII.) majd egy finnországi vizsgálatban is (Huittinen, 2003) megerősítésre került, hogy a *Chlamydia* infekció és az anti-Hsp antitestek között összeadódó kapcsolat van. Saját eredményeinket a melléklet XVII. cikkének 5. táblázata mutatja. A legmagasabb kardiovaszkuláris rizikó azokban mutatkozik, akikben egyszerre vannak anti-*C. pneumoniae* antitestek és anti-Hsp60 autoantitestek. Ezekben a betegekben több mint 80-szoros az esély súlyos koronáriabetegség kialakulására azokhoz képest, akik a mindkét szempontból negatívak. Huittinen (2003) és munkatársainak hasonló - azonban IgA anti-Hsp60 autoantitesteket mérő - vizsgálata 2,61-szeres rizikónövekedést dokumentált. Vizsgálatukban a rizikót tovább növelte, ha gyulladásos válasz is jelen volt (emelkedett szérum CRP-szint), ezekben a betegekben 17-szeres rizikónövekedést észleltek. Az eredményekből feltételezhető az, hogy azoknak a személyeknek fokozott a kardiovaszkuláris rizikója, akiknél egy *Chlamydia* infekciót anti-Hsp60 autoantitestek megjelenése követ. Ez a reakció kifejezheti azt a tényt is, hogy ezekben az emberekben a természetes antitest repertoár sérülékeny, a sajátot védő autoreaktivitás fertőzés hatására könnyen autoagresszióba csaphat át. Nagyon valószínű, hogy más

autoimmun betegségekben, ahol ismert a fertőzések kórfolyamatot provokáló hatása, hasonló mechanizmusok érvényesek.

Ezek az eredmények különös fontosságot adnak azoknak a vizsgálatoknak, melyek célja az anti-Hsp60 autoantitestszintek szabályozásának, kialakulásának vizsgálata. Ha sikerül azonosítani, hogy milyen tényezők okozzák a magas anti-Hsp autoantitestszint kialakulását (pl. egy *Chlamydia* infekciót követően), akkor a betegek (veszélyeztetettek) között olyan alcsoportok azonosíthatók, melyeknél eltérő, újabb megelőzési stratégiákra lesz szükség. Ilyen szabályozó tényezők lehetnek egyes genetikai faktorok és azok allélikus variációi, melyek között többről is ismert, hogy az immunválasz módosítására, hangolására, szabályozására képesek.

Genetikai tényezők és az autoantitestek termelésének szabályozása

Míg a Hsp65 antitestek jó markerei lehetnek a patogénnel való terheltségből származó rizikónövekedésnek, addig az anti-Hsp60 autoantitestek ezektől részben elkülönülve, más szabályozó tényezőkkel kapcsolatban mutatnak összefüggést a fokozott rizikóval. Az immundefektusok között jelennek meg ennél fogva azok a genetikai tényezők, amelyek fokozott autoantitest termeléssel mutatnak kapcsolatot. Ilyenek például a munkánkban bemutatott IL-6 és immunglobulin allélikus variációk.

Az előbbieken ismertetett két független vizsgálat (finn véradó férfiak és magyar egészséges populáció) egybehangzó eredménye nagymértékben megerősíti az IL-6 gén polimorfizmus és az anti-Hsp60 autoantitestek közötti kapcsolat jelentőségét.

Az interleukin-6 eredetileg, mint B-sejt differenciálódási faktor került leírásra (Hirano, 1986), de hamar felismerték multifunkcionális jellegét. Alapvető szerepet játszik az immunválasz szabályozásában, a haemopoiesisben, az akut-fázis reakcióban és gyulladásos folyamatokban (Hirano, 1998). Az IL-6 gén (*IL-6*) emberben a 7-es kromoszóma rövid karján található, 5 exonból és 4 intronból épül fel (Yasukawa, 1987). A gén komplex felépítésű regulátoros szakasza és promótere jelentősen hozzájárul az IL-6 sokoldalú viselkedéséhez. Az *IL-6* promóterét több transzkripciós faktor is bekapcsolja, míg szteroidok és a retinablasztóma kontroll elem gátolják működését. Az IL-6 biológiai hatásait befolyásolják génjének allélikus változatai. Több élettani és kóros állapottal kapcsolatban írták le egyes allélek eltérő előfordulását. Mind a promóter, mind a struktúrgén területén található polimorfizmusok, melyek közül kettővel kapcsolatban igen gazdag az irodalom. A gén 3' végén található változó számú tandem szekvencia (VNTR) egy multiallélikus polimorfizmus, míg a promóter -174-es pozíciójában egy G>C báziscserét találhatunk (Fishman, 1998). Ez utóbbi

polimorfizmus kapcsolatát több betegséggel is leírták, melyek között található az Alzheimer-kór, kardiovaszkuláris és daganatos betegségek, csontritkulás, II. típusú diabetes mellitus, szepszis és rheumatoid arthritis (áttekintését ld. Papassotiropoulos, 2001). A -174 G>C SNP funkcionális aktivitását is jellemezték: a G allél jelenlétében az IL-1 β vagy endotoxin stimulációra adott transzkripciós válasz fokozott volt a C allélhoz képest (Fishman, 1998). Ugyanakkor ellentmondásos eredmények születtek azokban a vizsgálatokban, melyekben kapcsolatot próbáltak keresni a -174 G>C polimorfizmus és a plazma IL-6-szintek között. Abban konszenzus mutatkozik, hogy különféle stimulusok után mért indukált IL-6-szintek magasabbak G allél jelenlétében, mint a CC genotípus esetén (Benneromo, 2004). A nyugalmi helyzetben mért IL-6-szintek és a -174-es SNP között viszont nincs kapcsolat. Ezek az eredmények együttesen magyarázhatják a korábbi ellentmondó tapasztalatokat.

Mindezek az ismeretek arra utalnak, hogy az IL-6 -174 GG genotípust hordozó személyek megnövekedett antitesttermeléssel válaszolhatnak antigén expozíció esetén, mivel a magasabb IL-6-szintek erősebb B-sejt aktivációt és proliferációt okozhatnak. Erre utal Kuwana és mtsai megfigyelése (Kuwana, 2000), amely szerint az *in vitro* keletkezett IgG anti-topoizomeráz I autoantitestek mennyiségét a T-sejt help határozta meg, ami az IL-6-szintekkel volt szoros összefüggésben. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy szisztémás sclerosisban szenvedő betegekben a poliklonális B-sejt aktivációt magas IL-6-szintek kísérik (Sato, 2004). Ezzel teljesen összhangban saját vizsgálatunkban is hasonló eredményeket kaptunk: a poliszisztémás autoimmun betegségben szenvedők közül a szisztémás sclerosisban és a nem-differenciált kötőszöveti betegségben szenvedőkben észleltünk emelkedett anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitestszinteket (VI.). Ehhez hasonló eredményeket már a 90-es évek elején is közöltek, szisztémás sclerosisban, és különösen annak progresszív formájában emelkedett anti-Hsp65 antitestszinteket mértek olasz kutatók (Danieli, 1992). Ezeket az eredményeket összevéve igen valószínű, hogy a szisztémás sclerosis patogenezisében fontos szerepet játszanak az anti-Hsp65 antitestek, melyek feltehetően kedvezőtlen genetikai tényezőket (pl. magas IL-6 termelésre hajlamosító *IL-6* -174 GG genotípus) hordozó személyekben a krónikus bakteriális infekciók (légúti betegségek, *H. pylori*) fellépése nyomán jelennek meg. Nem lehet azonban kizárni azt sem, hogy az *IL-6* gén -174-es polimorfizmusa része valamely nagyobb haplotípusnak, és az antitestek szintjét a haplotípus valamely más, ma ismeretlen tagja szabályozza.

2005-ig több, nem kardiovaszkuláris betegségben is leírták, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek vagy anti-Hsp65 antitestek emelkedett szinten fordulnak elő az adott állapotban. A 13. táblázatban összefoglalva láthatók ezek az eredmények. Az anti-Hsp60 autoantitestek

szintjének összefüggése az IL-6 citokinnel irodalomkutatásra ösztönzött bennünket. Megvizsgáltuk, hogy azokban a betegségekben, melyekben emelkedett anti-Hsp60 antitestszinteket közöltek, leírták-e az adott állapot összefüggését az IL-6-tal.

13. táblázat: Összefüggés egyes betegségek, anti-Hsp60 antitestszintek és az interleukin-6 koncentráció között

Betegség	A betegség és emelkedett anti-Hsp60 antitestszintek összefüggését bemutató munka	A betegség és az emelkedett IL-6 koncentráció kapcsolatát bemutató munka
<i>H. pylori</i> -val asszociált MALT lymphoma	Ishii, 2001 Takenaka, 2004	Hussell, 1993
Periodontitis	Tabeta, 2000	Okada, 1998
Guillan-Barré sy	Yonekura, 2004	Aarli, 2003
Posztoperatív pitvarfibrilláció	Mandal, 2004	Gaudino, 2003
I. típ. diabetes mellitus	Abulafia-Lapid, 2003 Weitgasser, 2003	Kristiansen, 2003
SLE, thromboticus szövődmények	Dieude, 2004	Cross, 1999
Zajártalom, hallásvesztés	Yang, 2004	-
Takayasu arteritis	Kumar-Chauhan, 2004	Noris, 1999
Schizophrenia	Wang, 2003	Schwartz, 2000
Akut anterior uveitis	Cancino-Diaz, 2004a	Bardak, 2004
Psoriasis vulgaris	Cancino-Diaz, 2004b	Elkayam, 2000
Szisztémás sclerosis	Danieli, 1992	Scala, 2004
Behcet-kór	Tanaka, 1999	Adam, 2004

A 13. táblázatban bemutatott vizsgálatok és áttekintő cikkek tanúsága szerint a feltüntetett betegségek közös jellemzői az emelkedett anti-Hsp60 autoantitestszintek és IL-6 koncentrációk. Két betegséggel kapcsolatban ismert az is, hogy a -174-es promóter polimorfizmus összefüggésben van-e az adott állapottal: (i) diabetes mellitusban a betegség pubertásban megjelenő formájában a -174 GG genotípus gyakoribb előfordulását észlelték, ami magasabb IL-6-szinttel járhat; (ii) Motoros szívűtétet követően a -174 GG hordozókban magasabb IL-6-szinteket, fokozott gyulladásos válaszreakciót és gyakoribb pitvarfibrillációs szövődményt észlelték.

Ezek az eredmények és összefüggések teret engednek annak, hogy feltételezzük, általános jellegű összefüggés lehet az IL-6 -174-es polimorfizmus, stimulust/gyulladást követő emelkedett csúcs IL-6 koncentrációk, és a megnövekedett anti-Hsp60 autoantitestszintek között. Feltételezésünk szerint a szervezetet ért károsodást követő gyulladásos reakció során egy túlzott IL-6 válasz erős B-sejt aktivációt és antitesttermelést okozhat. Ebben az esetben a természetes antitestek reguláló hálózata felbomlik, ami lehetőséget ad autoagresszió kibontakozásának és a szervezet integritását visszaállító gyulladásos folyamatok kisiklásának.

Ezt a hipotézist csak további vizsgálatokkal lehet majd alátámasztani vagy elvetni, melyekhez a 13. táblázatban felsorolt betegségeket célzó, prospektív tanulmányokra lesz majd szükség. Az immunglobulinok γ - és κ -lánc konstans régióiban az antigéndeterminánsokat a GM és KM allotípusok határozzák meg (Grubb, 1995). Az Ig allotípusok kifejezett eltérést mutatnak egyes emberi rasszok között, azonban egy rasszon belül meglepő állandósággal, kapcsoltsággal öröklődnek tovább a GM és KM haplotípusok. Mindezek arra utalnak, hogy bizonyos szelekciós tényezők biztosították generációról generációra az allotípusok megőrzését, melynek fő hajtója szelektív szelekciós előnyök létezése lehetett. A fertőzések, és az azokra adott antitestes immunválasz nagy valószínűséggel e tényezők közé tartoznak. Ezt a feltételezést több vizsgálat eredménye is alátámasztja. Például Pandey és munkatársai (2001) azt a megfigyelésüket közzétették, hogy a GM lókuszon z allélt hordozókban poliszacharid vakcinákkal való oltás után alacsonyabb a specifikus antitestszint, mint az f, f genotípust hordozókban. Fontos hangsúlyozni azonban azt is, hogy az Ig allotípusok elsősorban a T-independens antigénekre adott antitestválasz erejével mutatnak kapcsolatot. Feltehetően más génekkel (pl. HLA vagy IL-6) együttműködve mutatják csak az antitestválaszt módosító hatást T-dependens antigének esetén.

A GM f, z lókuszek kapcsolatát autoimmun reakciókkal szisztémás sclerosisban korábban már leírták (Pandey, 2001; Kameda, 1998). Azok a B-sejtek, melyek immunglobulin receptora bizonyos GM allotípust hordoz, hatásosabb antigén felvételre és feldolgozásra, valamint T-sejteknek való bemutatásra képesek, ami fokozott antitesttermeléshez vezethet. Az Ig allotípusok és az autoantitest válasz közötti kapcsolat mechanizmusát több elmélettel is lehet magyarázni. Az immunválaszt részben meghatározó variábilis régió determinánsok és a konstans régió allotípusok között fennállhat kapcsoltság (linkage disequilibrium). Az is lehetséges, hogy direkt kapcsolat van bizonyos idiotípusok kialakulása és Ig allotípusok között. Az allotípusok okozhatják a konstans régió struktúrájának változását is, ami közvetlenül befolyásolhatja az antitestek antigénkötőhelyének kinetikai viselkedését, valamint az antitestek sejtfelszíni receptorokkal mutatott kölcsönhatását.

Episztatikus kölcsönhatások, mint autoantitestszintekkel kapcsolatot mutató tényezők

Az anti-Hsp antitest koncentrációk kialakításában több tényező együttes hatása, kölcsönhatása is szerepet játszhat. Több ilyen interakció is azonosítható: dohányzás és fertőzések (pl. pulmonális *Chlamydia* vagy gastrointestinalis *H. pylori* infekció), fertőzések és genetikai tényezők (*Chlamydia* és MBL, XVIII. cikk) vagy antitesttermelés és genetikai tényezők (IL-6 és Ig genotípusok és anti-Hsp antitestek, XV, XVI. cikkek). Az általunk vizsgált jelleg

(autoantitest koncentráció) szabályozásában nemcsak egy-egy tényező fő hatása számíthat, hanem több (gyenge? Csermely, 2004) faktor összeadódó, egymással kölcsönhatásban levő hatása is (XIX, XX).

A kapcsoltság tágabb értelmezését jelenti, ha episztatikus, epigenetikai vagy funkcionális kölcsönhatásokat, kapcsolatokat keresünk az antitesttermelésben szerepet játszó molekulák között. A fent bemutatott saját vizsgálatainkban a gén-gén kölcsönhatások és autoantitestszintek közötti kapcsolat felismerése két tényezőn alapult: a vizsgált génnek független fő hatásán, és korábbi ismereteken (hipotézis). Csupán 6 lókuszt vizsgáltunk, és kettő esetében (IL-6 -174 és GM f, z) tapasztaltuk a kölcsönhatások autoantitestszinteket befolyásoló hatását. Igen valószínű, hogy nagy, genetikai információkat populációs szinten tartalmazó adatbázisok részletes, kölcsönhatások vizsgálatára is kiterjedő kiértékelésével a jövőben igen sok biológiai jellegzetességgel kapcsolatban derül majd fény a tényezők közötti kölcsönhatások alapvető szerepére. Ennek kellő értékelését azonban csak a kölcsönhatások természetének megfelelő ismeretével tehetjük.

A gén-gén kölcsönhatások alapvető jellegzetességei

A mendeli szabályok ismételt felismerése után röviddel nyilvánvalóvá vált, hogy az öröklődés multilókuszos természetét sokszor nem lehet az egyes gének hatásainak megfigyelésével és a hatások kombinálásával megmagyarázni. A gének hatásai sokszor kölcsönhatásban vannak egymással, ami új fenotípusok kialakulásához vezethet. Az öröklődés mendeli arányoktól való eltérésének jellemzésére kb. száz évvel ezelőtt William Bateson bevezette az episztázis fogalmát (Bateson, 1909). *Episztázisról* – eredeti jelentése szerint, ami biológiai megközelítést takar – akkor van szó, ha az egyik lókuszt hatása elfedi egy másik lókuszt allélikus hatását. Nem sokkal később Sir Ronald Fisher is megfogalmazta az episztázis definícióját, ám populációs szinten, statisztikai alapon (Fisher, 1918).

Ma az episztatikus hatás biológiai meghatározását a következők szerint adhatjuk: két génvariáns (polimorfizmus) közötti kölcsönhatás lehet direkt (DNS–DNS vagy DNS–mRNS) vagy indirekt (a fehérjetermékek által) oly módon, hogy a kölcsönhatás eredményeként jelentkező fenotípust módosító hatás (például betegség megjelenése) eltér a gének egymástól független, fő hatásaitól. Tekintettel arra, hogy a makromolekulák közötti kölcsönhatások igen elterjedtek, és az életműködés alapjait jelentik, joggal feltételezhető, hogy az episztázisok is közönségesen előforduló és jelentős biológiai szerepet játszó tényezők a genetikai működésben (Moore, 2003).

A további munkahipotézis ismertetése

Az előző fejezetekben összefoglaltuk az anti-Hsp60 autoantitestek viselkedését koronária betegségben. Kimutattuk, hogy ezek az autoantitestek a természetes antitest repertoárba tartozhatnak, és szintjük szabályozásában szerepe lehet fertőzéseknek és genetikai tényezőknek is. Ezek a tényezők összességükben, egymással kialakított kölcsönhatásaikban magyarázzák az atherosclerosis kialakulását és lefolyását. Tekintetbe véve, hogy a klasszikus rizikófaktorok, a fertőzéseket szabályozó tényezők és az autoantitestszintekkel kapcsolatban lévő genetikai faktorok között a független fő hatások mellett kölcsönhatás is lehet, a továbbiakban kiemelt figyelmet szenteltünk egy olyan adatkiértékelési módszer megismerésének és fejlesztésének, mely alkalmas a kölcsönhatásokra kiterjedő analízis kivitelezésére. Ennek a módszernek a teszteléséhez kiválóan alkalmasnak bizonyult az eredeti (először az I. cikkben közölt) betegek adatait tartalmazó adatbázis. A dolgozat utolsó fejezetében ennek az analízisnek az ismertetése található.

4, Az anti-Hsp60 autoantitestek és a koronária események kapcsolata

Az eseménymentes túlélés és az anti-Hsp60 autoantitestek kapcsolata koronária betegségben

Vizsgálatunkba 1996-ban bevont, súlyos koronária betegségben szenvedő, by-pass műtéten átesett betegeink klinikai állapotának felmérését, nyomonkövetését sikerült elvégeznünk 2000-2001 folyamán, átlagosan 5 évvel a by-pass műtét után. A 357 beteg közül 318 esetben (89,1%) sikerült információt szereznünk betegeinktől, hozzátartozóiktól vagy háziorvosuktól. A 318 sikeresen követett beteg közül 82 esetben fordult elő haláleset vagy kardiovaszkuláris esemény (haláleset 19 esetben, ezek között kardiovaszkuláris okból 11 esetben, nem kardiális okból [gastrointestinalis vérzés, malignitás, vírusos pneumonia] 4 esetben, 4 esetben ismeretlen maradt a halálok; nem fatális kardiovaszkuláris esemény 63 esetben (19 esetben új myocardialis infarctus, 21 esetben stroke, 19 esetben perifériás verőérbetegség kialakulása vagy progressziója, 4 esetben ismételt PTCA). Az összes sikeresen követett beteg, és az esemény bekövetkezése szerint kialakított alcsoportok klinikai jellegzetességeit, rizikófaktorait, immunológiai és genetikai adatait a 14. táblázat mutatja. A mérések a vizsgálatba kerüléskor levett, és -70 °C-on tárolt mintákból történtek az elmúlt években. A 14. táblázatban bemutatott eredményekkel együtt összesen 27 klinikai paraméter, 7 gyógyszeresedésre vonatkozó anamnesztikus adat, 11 infekciós és immunológiai marker és 26 genetikai adat került rögzítésre/meghatározásra 2005 elejéig (a meghatározások egy része kollaborációs munkák keretében született). A változók teljes listáját a 15. táblázat (75. oldal) mutatja.

14. táblázat: Súlyos koronária betegek eseményei (halálozás, új myocardialis infarctus, stroke vagy perifériás érbetegség) és egyes klinikai paraméterek kapcsolata

Változó	Összes beteg				Eseménymentes túlélők				Összhalálozás+kardiovaszkuláris esemény				p-érték*
	n	Medián	25%	75%	n	Medián	25%	75%	n	Medián	25%	75%	
Életkor (év)	318	58	52	64	236	57	52	63	82	58	53	65	0,219
Nem férfiak nők	318	0,76 0,24			236	0,77 0,23			82	0,74 0,26			0,616
Szérum koleszterin (mmol/l)	317	6,20	5,40	7,20	236	6,20	5,40	7,10	81	6,10	5,30	7,50	0,763
LDL koleszterin (mmol/l)	184	3,91	3,08	4,75	132	4,02	3,10	4,75	52	3,71	3,00	4,72	0,444
HDL koleszterin (mmol/l)	201	1,27	1,11	1,31	142	1,26	1,10	1,31	59	1,27	1,16	1,31	0,707
Triglicerid (mmol/l)	316	2,10	1,40	2,90	236	2,00	1,30	2,80	80	2,15	1,60	3,25	0,094
Lipoprotein (a) (mg/dl)	318	16,53	4,65	52,28	236	15,17	3,94	46,80	82	27,69	5,80	53,63	0,196
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	298	140	130	150	221	140	130	154	77	140	130	160	0,584
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	298	85	80	90	221	84	80	90	77	90	80	90	0,393
Testtömeg-index (kg/m ²)	313	0,28	0,26	0,31	233	0,28	0,26	0,30	80	0,28	0,26	0,30	0,813
Anti-cHsp60 (OD540)	155	0,14	0,09	0,30	118	0,13	0,09	0,30	37	0,17	0,08	0,36	0,981
Anti-Hsp60 (AU/ml)	318	100,00	48,18	201,53	236	90,65	47,86	173,80	82	131,56	56,72	268,35	0,036
Anti-Hsp65 (AU/ml)	290	14,57	7,40	30,24	214	14,25	7,03	27,41	76	16,28	9,19	36,21	0,186
Anti-GroEL (AU/ml)	318	25,84	11,67	54,71	236	26,31	11,60	51,42	82	24,55	10,21	62,85	0,907
Anti-koleszterin antitest (U/ml)	304	39,80	25,89	56,70	226	39,22	24,59	56,61	78	43,68	30,11	59,47	0,059
Komplement C3 (g/l)	242	1,30	1,08	1,60	180	1,32	1,09	1,54	62	1,26	1,07	1,70	0,98
C-reaktív fehérje (mg/l)	317	3,81	1,88	7,22	236	3,76	1,81	6,29	81	4,55	2,05	10,25	0,057
Anti- <i>H. pylori</i> index	315	2,20	1,30	3,00	233	2,20	1,40	3,00	82	2,30	0,90	2,90	0,741
Dohányzás soha valaha jelenleg is	312	0,32 0,58 0,10			233	0,32 0,61 0,07			79	0,33 0,52 0,15			0,094
NYHA osztály I II III	301	0,66 0,29 0,05			226	0,68 0,27 0,05			75	0,61 0,35 0,04			0,485
ApoE 33 2 hordozó 4 hordozó	314	0,69 0,11 0,20			232	0,68 0,13 0,19			82	0,73 0,05 0,22			0,108
Apo(a) 8 pentanukleotid 9 repeatszám 10 11 hordozás	280	0,45 0,26 0,25 0,04			207	0,44 0,25 0,28 0,03			73	0,40 0,32 0,23 0,05			0,161
C4A*Q0 hordozó nem hordozó	314	0,23 0,77			233	0,22 0,78			81	0,25 0,75			0,661
C4B génszám ≤1 >1	308	0,23 0,77			229	0,22 0,78			79	0,27 0,73			0,435
<i>Mbl</i> variáns allélt hordozó nem hordozó	199	0,44 0,56			145	0,45 0,55			54	0,43 0,57			0,777
ACE inhibitor szed nem szed	294	0,52 0,48			219	0,52 0,48			75	0,53 0,47			0,795

*Mann-Whitney t-próba vagy khi-négyzet próba, mbl: mannóz-kötő fehérje, ACE: angiotenzin konvertáló enzim

15. táblázat: A I. cikkben bemutatott koronária betegségben szenvedők mintáiban 2005 elejéig meghatározásra/rögzítésre került paraméterek listája

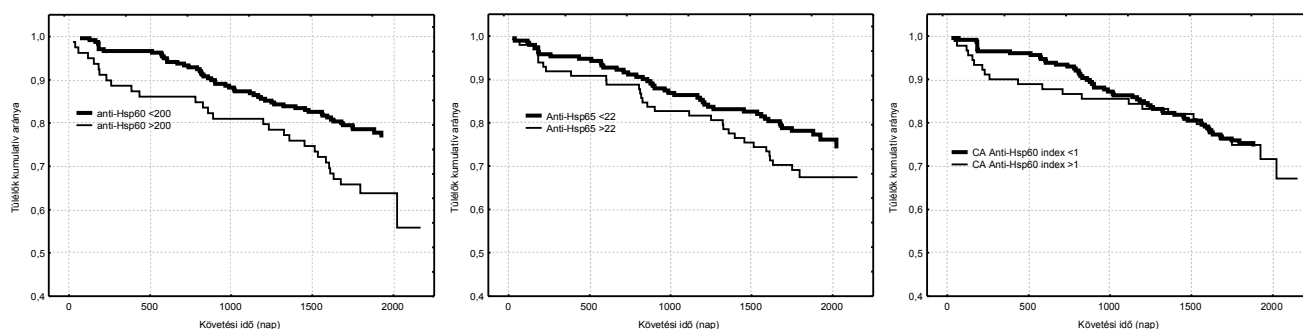
Klinikai adatok	Infekciós, immunológiai markerek	Genetikai adatok
Nem	<i>H. pylori</i> IgG	Trombocita IIIa glikoprotein PI A1/A2 polimorfizmus
Életkor	<i>C. pneumoniae</i> IgG (MIF)	ACE I/D polimorfizmus
Szérum össz-koleszterin	CMV IE IgG (ELISA)	ApoE genotípus
HDL koleszterin	cHsp60 IgG	Apo(a) pentanukleotid repeat szám
LDL koleszterin	CA Hsp60	21 hidroxiláz gén NcoI polimorfizmus
Szérum triglicerid	Hsp60 IgG	Komplement C4A fenotípus
Vércukor	<i>M. bovis</i> Hsp65 IgG	C4A*Q0 hordozás
Lipoprotein (a)	<i>E. coli</i> GroEL IgG	C4A*3 hordozás
Myocardialis infarktus az anamnézisben	Anti-koleszterin IgG	C4A*6 hordozás
Halálozás a követés során	Komplement C3-szint	Komplement C4B fenotípus
Halálozás dátuma	CRP-szint	C4B*Q0 hordozás
Myocardiális infarktus a követés alatt		Komplement B faktor fenotípus
Stroke a követés alatt	Gyógyszerszedés	Komplement C3 fenotípus
Perifériás érbetegség a követés alatt	P.o. antidiabetikum th.	Metilén-tetrahydrofolát reduktáz enzim -677 C>T polimorfizmus
Esemény dátuma	Inzulin th.	V-ös faktor Leiden mutáció
Szisztolés vérnyomás	Statin th.	C4A gének száma
Diasztolés vérnyomás	Fibrát th.	C4B gének száma
Testtömeg-index	Acetil-szalicilsav th.	Összes C4 génszám
Hypertonia	Syncumar th.	<i>mb12</i> genotípus
Diabetes mellitus	ACE-inhibitor th.	HSP70-2 1267 A>G polimorfizmus
Dyslipidaemia		TNFAfa -308 G>A polimorfizmus
Myocardialis infarktus a családi anamnézisben		TNFAfa -238 G>C polimorfizmus
Diabetes mellitus a családi anamnézisben		RAGE -429 polimorfizmus
Dohányzás		RAGE -374 polimorfizmus
NYHA osztály		Lymphotoxin-alfa 1 252 A>G polimorfizmus
Koronária stenosis súlyossága		Lymphotoxin-alfa 3 804 C>A polimorfizmus
Koronaográfia oka		

A 14. táblázat eredményeiből megállapítható, hogy vizsgálatunkban egyetlen rögzített vagy mért paraméter volt csak alkalmas önmagában az események előrejelzésére by-pass műtéten átesett, súlyos koronária betegekben. Erre részben (gyakorlati szempontból) a vizsgálat alacsony statisztikai ereje ad magyarázatot. Ahhoz, hogy szignifikáns ($p=0,01-0,05$) különbséget találjunk vizsgálatunkban a CRP esetében, a 82 tagú eseményt mutató és a 236 tagú, eseménymentes csoportok között, 4,95 mg/l-nyi különbséget kellett volna mérni. Jelenleg csoportjaink között 0,8 mg/l (csoportok átlaga \pm szórás 5,9 \pm 9,8 és 6,7 \pm 5,9) különbséget figyeltünk meg. 12-szer ekkora esetszámú vizsgálatra lett volna szükség ahhoz (az α 0,01-es szintje mellett), hogy ezt a különbséget szignifikánsnak találjuk. Ugyanakkor a jelenség elméleti magyarázatát az adja, hogy az atherosclerosis multifaktoriális etiológián

nyugvó folyamat. Kialakulásában, előrehaladásában több genetikai tényező és környezeti faktor együttes hatása a döntő. Nem is valószínű olyan paraméterek létezése, melyek önmagukban felelősek lehetnek olyan kemény klinikai végpontok kialakulásáért, mint a fatális vagy nem fatális kardiovaszkuláris események.

A 14. táblázat eredményei szerint koronária betegeinkben a halálozással és az új kardiovaszkuláris eseményekkel a legerősebb összefüggést az anti-Hsp60 IgG autoantitestek szintje mutatta. Ha az összehasonlítások számát (26) is figyelembe vesszük, akkor ez az összefüggés is lehet pusztán a véletlen műve, ezért a továbbiakban logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk a magas vagy alacsony anti-Hsp antitestszintek és az események kapcsolatának elemzésére. Eredményeink szerint a magas anti-Hsp60 IgG-szintek szignifikánsan előre jelzik koronária betegekben az összhálózást és a kardiovaszkuláris események bekövetkeztét a követés ideje alatt. Az esély-hányados 2,03 (1,17-3,53), vagyis kb. kétszeres rizikónövekedést szenvednek el azok, akikre magas antitestszint jellemző. Az életkor és nem szempontjából illesztett modellben nem volt lényeges változás a nem illesztett modellhez képest. Az anti-Hsp65 IgG vagy CA anti-Hsp60 vonatkozásában nem tapasztaltunk szignifikáns összefüggést.

Tekintettel arra, hogy a halálozás ill. események dátuma ismert volt betegeink esetében, túlélési analízist is végrehajthattunk (14. ábra).



14. ábra: Az eseménymentes túlélők arányának összefüggése az anti-Hsp antitestekkel. Az alacsony és magas antitestszintek a kontroll csoport 90. percentilisének értéke szerint kerültek kialakításra. Lograng próba $p=0.008$ (Hsp60 IgG), 0,102 (Hsp65 IgG) és 0,616 (CA Hsp60).

A túlélési/eseménymentes időket figyelembe vevő analízisünk során a logisztikus regresszió eredményeinek megfelelő eredményeket kaptunk. Az anti-Hsp60 IgG-szintje érzékeny mutatója a halálozás és események bekövetkeztének. Az átlagosan 5 éves követés végén a magas anti-Hsp60 autoantitest csoportban a betegeknek csak kb. 55% tartozott az eseménymentes túlélő csoportba, míg az alacsony antitest csoportban ez az arány majdnem 80% volt. Ezek az eredmények támasztják alá azt a következtetésünket, hogy az anti-Hsp60

autoantitestek a koronária betegek egy jelentős alcsoportjában patogén szereppel bírnak, részt vesznek az atherosclerosis kialakításában, előrehaladásában és a betegek életét veszélyeztető koronária események kialakulásában.

A hagyományos adatkiértékelés formái (egyszempontos analízis, vagy korlátozott számú változót beépítő regressziós modellek) nem teremtenek lehetőséget az egyes tényezők között fellépő interakciók hatásának felderítésére. Ez az oka annak, hogy új szemléletű megközelítéssel, az adatok logikai analízisen nyugvó feldolgozásával is kiértékeljük eredményeinket.

Logikai adatfeldolgozás (LAD)

Eredményeink (3. fejezet) a gének közötti kölcsönhatások természetes autointitést szintet szabályozó jellegét mutatták. Az interleukin 6- és az immunglobulin gének közötti kölcsönhatás (episztázis) szignifikáns hatással volt az anti-Hsp60 IgG-szintekre egészségesekben. A kölcsönhatások jellemzésére egy újfajta adatfeldolgozási módszert alkalmaztunk. Ez a módszer rövid időn belül, különleges számítógépek alkalmazása nélkül teszi lehetővé a változók közötti kölcsönhatások azonosítását nagy, valós adatokat tartalmazó adatbázisokban. A módszer neve *logikai adatanalízis* (logical analysis of data, LAD), melynek leírója Hammer Péter (Crama, 1988), hazai kidolgozói, fejlesztői az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Operáció Kutatás tanszékének munkatársai, Dr. Vízvári Béla és Csizmadia Zsolt (Csizmadia, 2004). Célunk a LAD módszer alkalmazásával a koronária betegek adatait tartalmazó adatbázisunk kölcsönhatások vizsgálatára is kiterjedő feldolgozása volt.

Az elmúlt évek kutatásai nyilvánvalóvá tették, hogy a komplex betegségeket (jellegeket) főleg a gén-gén és a gén-környezet *kölcsönhatások* (interaction) határozzák meg, és csak kevésbé fontos egy-egy tényező vagy genetikai mutáció szerepe, mint független, fő hatás (main, independent effect). Nem kristályosodott azonban még az ki, hogy ezek a gén-gén és gén-környezet kölcsönhatások milyen gyakoriak, és hatásuk milyen erős. Ez elsősorban annak tudható be, hogy ma még nem rendelkezünk olyan adatfeldolgozási módszerekkel, melyek egy nagy (például több ezer változót (pl. SNP-t) meghatározó) vizsgálat kiértékelése során a lehetséges kombinációk csillagászati számát elfogadható időn belül értékelni tudnák.

Lehetséges, hogy a jövőben a számítógépek fejlődésével megvalósítható lesz óriási adatbázisok teljes körű (interakciókra kiterjedő) kiértékelése. Valószínűbb azonban, hogy a fejlődés két másik irányba gyorsabban fog haladni. Az egyik ilyen irány az óriási adatbázisok hipotézisen (előzetes ismereteken) nyugvó, és ezért nem teljes körű analízise. Ebben az

esetben azonban sok hasznosítatlan információ „maradhat” az adatbázisban. A másik fejlesztési irány ezzel szemben olyan új adatfeldolgozási metodikák kidolgozását célozza, amelyek az adat-redukció és a kombinatorika alkalmazásával valósítják majd meg nagy adathalmazok kiértékelését. Ami főleg kecsegtető, ezek a módszerek alkalmasak lesznek az adatok közötti interakciók felderítésére is.

Hogyan lehet felismerni a változók közötti kölcsönhatásokat?

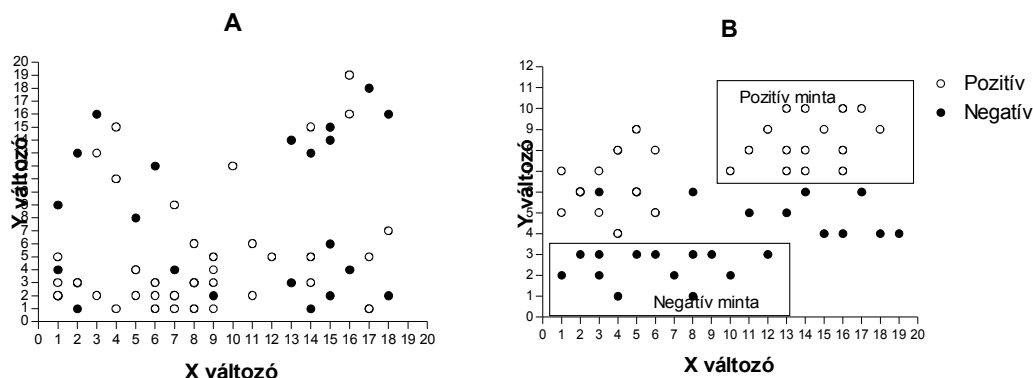
A változók közötti kölcsönhatások detektálására alkalmas statisztikai módszerekről két összefoglaló munka is megjelent nemrégiben (Hoh, 2003; Thornton-Wells, 2004). A helyes módszer megválasztását befolyásolja, hogy diszkrét (kategória) vagy folytonos változó-e a vizsgált jelleg. Az igen elterjedt eset-kontroll (asszociációs) vizsgálatokban használhatunk hagyományos statisztikai módszereket, mint amilyenek a *varianciaanalízis* és különféle *regressziós modellek*. Ezen módszerek legfőbb korlátját ezekben az esetekben a „*dimenziók átká*” jelenti. Tegyük fel, hogy egy vizsgálatban (száz beteg és száz kontroll) három gén alléljeinek eloszlását (mindegyik génnek három genotípusát) mértük fel, és nem tapasztaltunk különbséget a vizsgált allélek megoszlásában a két csoport között. Ha ebben az esetben meg kívánjuk vizsgálni, hogy a gének között kimutatható-e kölcsönhatás, legalább 81 féle kombinációt kellene megvizsgálunk. Könnyen belátható, hogy ebben az analízisben a ritka allélek esetében lesznek olyan genotípus-kombinációk, amelyeket nagy valószínűséggel egy beteg és kontroll sem hordoz. Ez nagyon megbízhatatlanná és kivitelezhetetlenné teszi a hagyományos regressziós modelleket, mindezt amellet, hogy csak három gén kombinálódását vettük figyelembe. Még ha növelnénk is vizsgálatunk esetszámát, akkor is csak gyakori allélek vizsgálatával érhetnénk el jobb eredményeket. És hol vagyunk még a több száz vagy több ezer SNP-t meghatározó vizsgálatokban megfigyelhető mintázatoktól?

A fent említett két munka részletes áttekintést ad azokról a metodikákról, melyek alkalmasak a „*dimenziók átkának*” legyőzésére és az interakciók elemzésére. Közös jellemzője ezeknek a vizsgálatoknak, hogy az *adatok mennyiségének redukálását* (vagyis a dimenziók számának csökkentését) vetik be a kivitelezhetőségért.

A logikai adatfeldolgozási módszer (LAD) az adatredukálást kombinatorikus és optimalizációs módszerek alkalmazásával éri el (Alexe, 2004). A módszer lényege az, hogy a vizsgált személyek két csoportját (pl. kardiovaszkuláris esemény a követés során igen/nem, egyszerűsítve: negatív vagy pozitív megfigyelések) a változók valamilyen kombinációjával egymástól elkülönítsük. Ha a vizsgált személyek mért/regisztrált paraméterei (pl. X és Y változók) nem alkalmasak önmagukban a két csoport elkülönítésére (ezt szemlélteti a 15. ábra

A panel), akkor ez a feladat statisztikai értelemben nehéz. A hagyományos módszerek (logisztikus regresszió vagy Cox hazards modellek) alkalmazásával jelentős, azonban csak a vizsgált populáció valamely kis részhalmazára érvényes eredmények nyerhetők. Az orvosi biológiai kutatásokban sokszor jelenik meg az el nem választható csoportok problematikája (pl. magas rizikójú betegek elkülönítése az alacsony rizikójúaktól), így az erre a problémakörre kidolgozott megoldások alapvető fontosságúak lehetnek.

A LAD módszer kombinatorikus eljárásokat alkalmaz egy adatbázison belül minták létrehozásához, és a negatív/pozitív megfigyeléseket ezekkel a mintákkal jellemzi (15. ábra, B panel). Minta ebben az értelemben olyan változókombinációkat jelent, melyek jellemzik a pozitív/negatív megfigyeléseket. Az adatbázis változóit „kicsi” vagy „nagy” értékek jellemzik, melyek segítségével az adatbázis részekre bontható (vágópontok). Sok esetben az összes vágópont, és azok kombinációinak a kipróbálására nincs lehetőség belátható időn belül. A LAD módszer során ezért a negatív/pozitív megfigyeléseket legjobban elkülönítő változók kerülnek először kiválasztásra és ezek után a minták definiálásához az ezekkel legjobban együttműködő (ami matematikai értelemben vektor korrelációt jelent) változók kerülnek meghatározásra és kipróbálásra heurisztikus modellezés segítségével (support set). A kiválasztott változók legtöbb esetben igen mérsékelt korrelációt mutatnak a negatív/pozitív megfigyelésekkel, azonban a kombinációik összesített szétválasztó hatása meglepően jó. A minták közül csak azok kerülnek további feldolgozásra, melyekkel a kívánt hatásfokú szétválasztás elérhető. A kiválasztott minták sokaságából azok az igazán értékesek, melyek alacsony fokúak (definiálásukhoz 2-5 változó szükséges, ezért jelentésük átlátható, értelmezhető), prevalenciájuk magas (a lefedni kívánt negatív vagy pozitív megfigyelések legalább 10-30%-a valóban lefedésre kerül) és homogenitásuk kellően magas (80-100%, 100%-os tiszta mintát ritka esetben lehet nagyobb adatbázisok esetén létrehozni). A minták minőségét befolyásoló paraméterek változtatására, beállítására van lehetőség, így kísérletezéssel határozható meg a legjobb minták egy adott adatbázis vonatkozásában. A jó minőségű minták segítségével építhetők fel az ún. LAD modellek, melyek több minta alkalmazásával a populáció lehető legtöbb tagját lefedik. A LAD modellek definiálására szolgáló minták változókombinációi jelezhetik azokat a változó kölcsönhatásokat (interakció), melyek felderítésére hagyományos módszerek alkalmazásával gyakorlatilag nincs lehetőség. A LAD modellek különösen alkalmasak arra, hogy egy adatbázisban alcsoportokat különítsenek el, a változók fontosságát jelezzék, és újabb hipotézisek felállítását segítsék. A módszer részletes leírása Alexe és mtsai 2004-ben megjelent publikációjában olvasható.



15. ábra: Pozitív és negatív megfigyelések ábrázolása két változó (X és Y) függvényében. Az **A** panelen egy szét nem választható sokaság, a **B** panelen logikai mintákkal részben szétválasztható sokaság látható. A **B** panelen a negatív mintát az $X < 13$ és $Y < 4$, míg a pozitív mintát az $X > 9$ és $Y > 6$ feltételekkel lehet definiálni. Ezek a negatív/pozitív minták csak negatív/pozitív megfigyeléseket fednek le, ezért ezeket „tisztá” mintáknak nevezzük. Az X és Y változók értékeinek módosításával olyan mintákat is létre lehet hozni, melyek az összes lefedni kívánt megfigyelést lefednék (prevalenciájuk 100% lenne), példánk esetében ezek azonban nem lennének tiszta minták. A minta homogenitása a lefedési helyességet fejezi ki. A minták definiálásához több változó is felhasználható, ám ezek egyszerű szemléltetése a nagyobb dimenziószám miatt nem lehetséges.

A kardiovaszkuláris események és klinikai paraméterek kapcsolatának elemzése logikai adatfeldolgozással

A kardiovaszkuláris események és egyes klinikai változók feldolgozását logikai adatanalízissel azért végeztük el, hogy felderítsük, milyen szerepe van a változók közötti kölcsönhatásoknak az események keletkezésében. Ugyanis ha a betegek különféle alcsoportjaiban eltérő patomechanizmussal, más-más okból fejlődik ki az adott kórállapot, hagyományos adatfeldolgozással (regressziós modellek) csak korlátozott mértékben deríthető fel a változók közötti kölcsönhatások szerepe. A LAD módszer kiválasztja az adatbázisból azt a változót, amely a legjobb hatásfokkal tudja elkülöníteni a negatív (esemény nem következett be) megfigyeléseket a pozitívaktól (esemény a követés alatt). A módszer a következő lépésben kiválasztja az ezzel a változóval legjobban „együtműködő” változó(ka)t. Ezután megpróbál az újabb változóval/változókkal még jobb elkülönítést elérni (a még jobb esetben azt jelenti, hogy a kívánt prevalenciát a megkövetelt homogenitás mellett elérje, például „fedje le” le a negatív megfigyelések 50%-át úgy, hogy a homogenitás >90% legyen, azaz a lefedettek kevesebb, mint 10%-a legyen pozitív). Ha ezt nem sikerül elérni, újabb, a következő legjobban együtműködő változót illeszti be a mintába (pattern), és így tovább. A LAD módszer alkalmazása tulajdonképpen az adatbázissal való kísérletezést jelenti, hiszen többször is van lehetőség kipróbálni, hogy milyen elkülönítést lehet elérni, ha változtatjuk az analízis alapbeállításait, melyek: maximum hány „együtműködő” változó illeszthető a mintába (a minta foka), milyen lefedettség érendő el (prevalencia), mi a megkövetelt

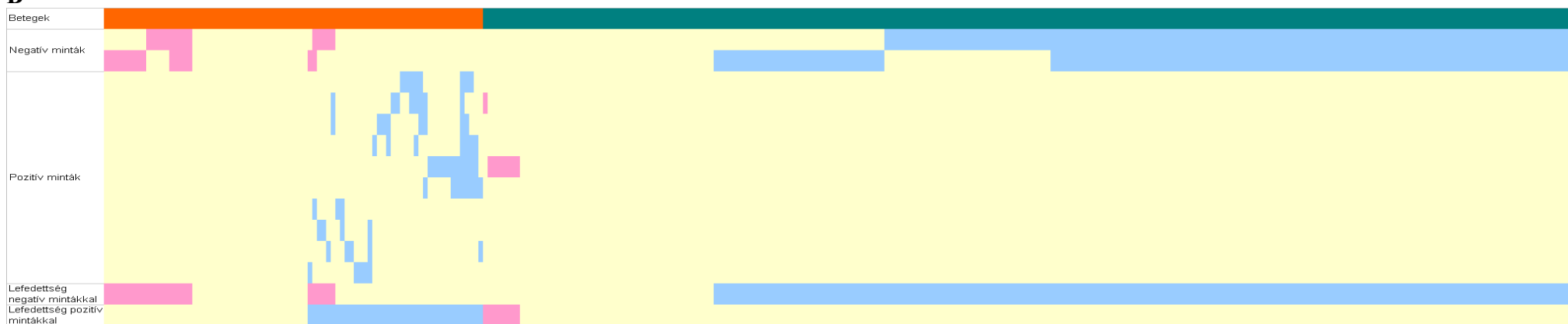
homogenitás, és a változók kiválasztásánál hány együttműködő változóból történik a válogatás. A cél természetesen az, hogy a lehető legtöbb megfigyelést, tisztán, a lehető legkisebb fokú (könnyen értelmezhető) mintával fedjük le. A LAD módszer erejét az adja, hogy kombinatorikus modellezést alkalmaz, vagyis minden változó minden lehetséges vágópontját kipróbálja. A program (mint minden statisztikai feldolgozás) gyenge pontja a hiányzó adatok kezelése. Jelen adatfeldolgozásunkban a hiányzó adatok átlagértékkel való behelyettesítését választottuk. (Tapasztalatunk szerint az átlag behelyettesítése, vagy a min. és max. értékek közötti random értékekkel való feltöltés nem okoz lényeges eltérést az analízis eredményében). Ugyanakkor a hiányzó adatokat tartalmazó személyek kizárása (tekintettel arra, hogy ez nem konzekvensen fordult elő, vagyis majdnem minden személynek hiányzott egy vagy több adata) lehetetlenné tette volna az adatbázis elemzését. Ugyanakkor az átlag „gyakori” jelenléte egy változóban okozhat fals eredményt (ld. a P5 minta esetét alább). A kombinatorika alkalmazásával és az alapbeállítások változtatásával érhető el, hogy az elméletileg lehetséges igen nagyszámú mintából végül csak azt a néhány százat vagy ezret adja eredményül a program, ami az adott kérdés tisztázásához szükséges és elégséges.

A rendelkezésünkre álló adatbázis 71 változót tartalmazott, a változók teljes listáját lásd a 15. táblázatban a 76 oldalon. A 16. ábra (ld. következő oldalon) mutatja be a LAD alkalmazását a koronária betegek két csoportjának (halálozás és kardiovaszkuláris esemény a követés alatt: igen [pozitív megfigyelés]/ nem [negatív megfigyelés]) elkülönítésében. A negatív megfigyelések közül a legnagyobb lefedettség (78,8%) a következő LAD paraméterekkel volt elérhető: a minták foka max. 8, megkívánt prevalencia: 10%, megkívánt homogenitás: 90%, a mintaépítés a legjobb 10 változóból történt. Ezekkel a beállításokkal összesen 88 mintát nyertünk, a minták két csoportba voltak oszthatók aszerint, hogy mely változókra építkeztek (a 16. ábrán az N1 és N2 minták). A 88 minta ugyanazon változók más-más vágópontjaival lett kialakítva, az általuk elért különböző lefedettség minor eltéréseket adott, az ábrán a két legjobb minta van feltüntetve. A két negatív minta külön-külön a negatív megfigyelések kb. 63%-át fedte le helyesen, míg a pozitívaknak kb. 23%-át fedte le tévesen. A két minta közös jellegzetessége (vagyis az eseménymentes 5 éves túlélés jellemzője koronária betegségben), hogy alacsony CRP-szintek és alacsony anti-Hsp60 autoantitestszintek és közepes (nem túl magas és nem túl alacsony) komplement C3-szintek fordulnak elő egy adott személyben. Ezen felül az N1-es minta további jellemzője az alacsony LDL koleszterinszint és alacsony triglicerid koncentráció és soha el nem kezdett vagy abbahagyott dohányzás és a nem túl magas életkor. Az N2-es minta további jellegzetessége az apoE4 allél hiánya és nem túl magas anti-Hsp65 antitestszint és nem túl alacsony koleszterin koncentráció és nem túl

A

Minta	Változók																					Prevalencia (%)		
	LDL	CRP	Anti-Hsp60	C3	dohányzás	TG	Életkor	ApoE	Anti-Hsp65	TC	Anti-cHsp60	NYHA	RR sziszt.	RR diaszt.	C4B génszám	ACHA	Lp(a) TTTTA _n	Anti-GroEL	HP index	ACE-inhibitor	Mbl genotípus	Lp(a)	P	N
N1	<7,07	<11,5	<303	0,96-1,99	Soha v. valaha	<5,45	<69,5																0,195	0,635
N2		<10,2	19,2-341	>0,9				33 v. 2 hordozó	<47,75	>4,3	>0,047												0,182	0,637
P1			>303									II v. III	<162										0,134	0
P2		1,32-2,32	>303	>0,86																			0,097	0,004
P3			>303						30-126						>1								0,097	0
P4			303-404													>23							0,085	0
P5	<4,48	>12,58															>8	>5,07					0,134	0,03
P6		>12,11	>179																				0,097	0
P7													>132						>4,5				0,036	0
P8							73,5													szed	V/0 v. 0/0		0,048	0
P9						>6,6																>46	0,061	0
P10											<0,047			>87	<3								0,061	0

B



C	Negatív megfigyelés (esemény nincs) n=236	Pozitív megfigyelés (esemény van) n=82
Helyesen lefedett (n, %)	186 (78,8)	32 (39,0)
Le nem fedett	42 (17,7)	25 (30,4)
Tévesen lefedett	8 (3,5)	19 (23,1)
Mindkét mintával lefedett	0 (0)	6 (7,5)

16. ábra: Logikai adatfeldolgozással (LAD) nyert minták és a súlyos koronária betegségben szenvedők követése alatt bekövetkezett események (halálozás és új kardiovaszkuláris események) összefüggései. Az **A** táblázatban a 2, negatív megfigyeléseket (esemény nincs) ill. a 10, pozitív megfigyeléseket (esemény van) lefedő minta definíciója és prevalenciája látható. A **B** rész az egyes minták találati arányait tünteti fel. Minden oszlop egy külön embert jelez, egy embert több minta is lefedhet. Az ábrán eltérő színek jelzik a találati helyességet, melyet a **C** táblázat foglal össze (a színek jelentését ld. jobb oldalon). A C táblázat a minták egyesített, negatív ill. pozitív megfigyelésekre vonatkozó prevalenciáját és találati helyességét mutatja.

	esemény nincs
	esemény van
	helyesen lefedett
	tévesen lefedett
	le nem fedett

alacsony anti-*Chlamydia* Hsp60 antitest koncentráció együttes előfordulása az adott személyekben.

A pozitív megfigyelésekkel kapcsolatban más jellegű képet tapasztaltunk (16. [ábra](#)): 10 mintával is csak a megfigyelések 39%-a volt lefedhető, (20%-os hiba és jelentős hiány (30,4%) mellett). Ezt a lefedettséget a következő LAD beállításokkal sikerült elérni: a minták foka max. 6, megkívánt prevalencia: 7%, megkívánt homogenitás: 90%, a mintaépítés a legjobb 40 változóból történt. A 10 minta egyike sem volt robusztus, a legnagyobb prevalenciát a P1-es és P5-ös minták esetében láttuk (13,4%), de voltak csupán 4-6%-os minták is. Ugyanakkor ezek a kicsiny minták általában tiszta minták voltak. Ennél az esetszámnál (a 82 pozitív megfigyelés 10%-a is csupán 8 embert jelent) nem lehet eldönteni, hogy biológiai értelemben jelentős-e a kapott eredmény, vagyis a pozitív minták a betegek valós alcsoportját különítik-e el, vagy sem. Feltehetően mindkét lehetőség előfordul mintáink között. A pozitív mintákban bizonyos csoportok és tendenciák felismerhetők. A P1-P4 minták közös jellegzetessége a (kórosan?) magas anti-Hsp60 autoantitestszint, ami együtt jár az előrehaladott szívelégtelenséggel és nem túl magas szisztolés vérnyomással (P1) vagy alacsony CRP és nem csökkent C3-szintekkel (P2) vagy kórosan emelkedett anti-Hsp65 antitestszintekkel (P3, magas a keresztreakáló antitestek szintje?) vagy emelkedett anti-koleszterin antitestszintekkel (P4, kórosan fokozott mennyiségű autoantitestszintek). A P5 és P6-os minták közös jellemzője a kórosan fokozott CRP-szint, továbbá normál LDL-szint de kedvezőtlen apo(a) pentanukleotid repeat szám (>8, ami emelkedett Lp(a)-szintet okozhat [XXI.]) hordozás és emelkedett anti-GroEL antitestszint (P5) vagy csupán mérsékelten emelkedett anti-Hsp60 autoantitestszint (P6). A P7-P10 minták prevalenciája olyan kicsiny, hogy ezeknek biológiai jelentőséget nemigen tulajdoníthatunk, bár kardiovaszkuláris események fokozódása hypertóniával és *H. pylori* infekcióval (P7), vagy emelkedett triglicerid és Lp(a)-szintekkel (P9) valós klinikai tapasztalat, ismert patofiziológiai mechanizmusokkal.

A LAD analízis során nyert mintákat együttes értékük szempontjából is feldolgoztuk. Megvizsgáltuk, hogy mekkora a halálozás vagy a kardiovaszkuláris esemény bekövetkeztének az esélye betegeink között, ha bármely pozitív mintát hordozzák azokhoz képest, akik nem hordoznak pozitív mintát. Ehhez az analízishez logisztikus regressziós modellezést alkalmaztunk. Szignifikáns, 24,61-szeres (95% CI 10,7-56,5) rizikónövekedést jelent, ha az adott beteg a 10 pozitív minta közül bármelyiket hordozza. Fordított analízist is elvégeztünk, bármely negatív minta hordozása szignifikáns, több mint 7-szeres rizikócsökkenést jelent

betegeink körében azokhoz képest, akik nem hordoztak negatív mintát (esély-hányados 0,136; 95% CI 0,077-0,24).

Megbeszélés

A koronária betegségben szenvedő betegeink követését átlag 5 évig sikerült megvalósítanunk. Ebben az időben a betegek kb. 26%-a halt meg vagy szenvedett el új kardiovaszkuláris eseményt. Adatbázisunkat kiértékeljük abból a szempontból, hogy a vizsgálat kezdetekor rögzített/mért változók mutatnak-e összefüggést a későbbi eseményekkel. Megállapítottuk, hogy önmagukban csak az anti-Hsp60 autoantitestszintek hordoznak prognosztikai értéket. A túlélési görbék lefutása szerint a betegek egy jelentős alcsoportjában felelőssé tehető a saját Hsp60-at károsító autoimmun reakció a későbbi eseményekért.

Az irodalmi adatok nem mutatnak egységes képet az anti-Hsp60 autoantitestek prospektív értékének vonatkozásában. Eddig 2 ilyen vizsgálatot közöltek (Huittinen, 2002, és IX), ezek közül a finnországi vizsgálatban az IgA alosztályú anti-Hsp60 antitesteknek volt prognosztikai értéke, míg a HOPE vizsgálatban azt találtuk, hogy nincs összefüggés az anti-Hsp60 autoantitestek és a kardiovaszkuláris események között. Mint az korábban részletesen megbeszélésre került (35. [oldal](#)), több oka is lehet ezeknek a különbségeknek. A jövőben folytatni kell az anti-Hsp60 autoantitestek szerepének vizsgálatát oly módon, hogy azokat a tényezőket is rögzíteni, mérni és analizálni kell, melyekről időközben ismertté vált, hogy befolyásolhatják az antitestek szintjét. Munkacsoportunkban a jövőben ilyen új vizsgálatok szervezésével szeretnénk foglalkozni.

A súlyos koronária betegek vizsgálatával felépített adatbázisunk időközben alkalmassá vált arra, hogy alcsoportok után kutassunk, hiszen 71 változó volt található 2005 elején az adatbázisban. A komplex betegség komplex módon történő kiértékeléséhez azonban új adatbányászási módszerhez kellett nyúlnunk. A logikai adatfeldolgozás módszerét korábban sikeresen alkalmazták már orvosi adatbázisok kiértékelésére (Alexe G, 2004, Alexe S, 2003, Lauer, 2002), melyen felbuzdulva mi is megpróbálkoztunk továbbfejlesztésével és felhasználásával. A LAD módszerrel patofiziológiailag releváns modelleket tudtunk felépíteni. Kifejezetten robusztus modelleket kaptunk az eseménymentes személyek jellemzésekor, akiknek a 78,8%-a (11,8%-os hibával és 17,7%-os hiánnyal) lefedhető volt két nyolcadrangú mintával (N1, N2). A negatív minták robusztus jellegét feltehetően az adja, hogy bizonyos alapvető, kedvező klinikai jellemzők együttes előfordulása szükséges és elégséges az eseménymentes túléléshez koronária betegségben. Vizsgálatunkból az derült ki,

hogy ezek a jellegzetességek alapvetően kedvező immunológiai állapotra utalnak. Az eseménymentes betegek 47,9%-ának (az N1 és N2 minta közös halmaza) jellemzője volt a CRP akut fázis fehérje alacsony szintje és a C3 fehérje nem túl alacsony (nincs komplement konszumpciót okozó noxa) vagy nem túl magas (nincs akut fázis reakciót okozó hatás) szintje és a nem túl magas anti-Hsp60 autoantitestszint (ami lehet jele a kedvező természetes autoantitest repertoárnak és az infekciók indukálta keresztreagáló antitestek hiányának is). Az N1-es mintában ehhez kedvező lipid profil és a dohányzás hiánya társul nem túl magas életkorral, melyek együttes jelenléte régóta kikristályosodott kedvező prognózist jelentő klinikai állapot. Az N2-es mintában a kedvező immunológiai állapot részben a lipidanyagcserére vonatkozó változók (apoE genotípus és koleszterinszint), és az anti-Hsp antitestekre utaló jellegzetességekkel egészül ki. Ezek szerint az eseménymentes túlélést biztosíthatja, ha valaki nem hordoz E4 allélt az apoE lókuszon és koleszterinszintje nem túl alacsony. Ez a jellegzetesség meglepően hangzik első ránézésre, hiszen az emelkedett össz- és LDL-koleszterinszint klasszikus rizikófaktor a koronária betegségnek. Ugyanakkor az elmúlt években egyre több figyelmet kapott a rizikófaktorok reverz-epidemiológiája, vagyis az a tény, hogy a krónikus érbetegségek késői szakaszában a klasszikus rizikófaktorok előfordulása megváltozik. A legtöbbet vizsgált ilyen állapotok a kongesztív szívelégtelenség (melynek leggyakoribb kiváltója a koronária betegség) és a krónikus veseelégtelenség. Ezekben az állapotokban a késői szakaszban az alacsony koleszterinszint (ami sokszor a betegség súlyosságának, senyvesztő jellegének, táplálkozási nehézségeknek és kísérőbetegségeknek a jele) rossz prognosztikai jel, és a mortalitás jelzője. Erre utaló adatokat az irodalomban is találhatunk (Horwich, 2002), és ugyanezen a beteganyagon magunk is megfigyeltünk (XXII. cikk, 4. táblázat). Az anti-Hsp65 és anti-cHsp60 antitestekkel kapcsolatosan az N2 minta jellegzetessége, hogy nem túl alacsony és nem túl magas antitestszinteket definiál. Ez megfelel az N2 minta anti-humán Hsp60 autoantitestekre vonatkozó definíciójának is. A nem túl magas anti-Hsp65 antitestszint arra utal, hogy ezeknek a személyeknek feltehetően nincsenek a bakteriális Hsp65-re jellemző epitópokkal (5, 6, 10, 11, 12 epitópok az 5. ábrán) reagáló antitestjei. Ebben a csoportban feltehetően alacsony a patogénnel való terheltség, és az infekciók kellő kontroll mellett zajlanak. A nem túl alacsony anti-cHsp60 antitestszint viszont megerősíti azt a feltételezést, hogy szükség van kellő mennyiségben anti-Hsp60 antitestekre. A védő, reguláló természetes autoantitest repertoár induktori nagy valószínűséggel a kellő immunológiai (gyulladás) kontroll mellett bekövetkező, krónikus formába át nem alakuló infekciók. Ezt az elméletet (az élethez szükséges stressz) a gyulladásos bélbetegség szempontjából nemrég két összefoglaló

munkánkban is ismertettük (XIX., XX). A túlzottan alacsony anti-Hsp60 autoantitestszintek kedvezőtlen hatását egy ezidáig nem közölt vizsgálatunkban is észleltük. Kongesztív szívelégtelenségben szenvedő betegeinkben azt tapasztaltuk, hogy alacsony az anti-humán Hsp60 autoantitestek szintje a súlyos szívelégtelenségben nem szenvedőkhöz képest, és az alacsony antitestszint összefüggésben van a szívelégtelenség progressziójával és a kedvezőtlen kimenetellel.

A pozitív megfigyelések nehéz lefedhetősége, fragmentáltsága nagy valószínűséggel a kórállapot (kardiovaszkuláris események) heterogén, multifaktoriális etiológiájából ered. Más szavakkal ez azt is jelentheti, hogy a negatív megfigyeléseknél azonosított tényezők bármelyikének „romlása”, sérülése kardiovaszkuláris eseménnyel járhat. A pozitív minták alapvetően az akut-fázis fehérjék (CRP és C3) emelkedett szintjére, a lipid paraméterek kóros értékeire (triglicerid és Lp(a)) valamint az anti-Hsp antitestekre épültek. A pozitív minták ilyen nem random felépítése biológiai jelentésre utal.

Vizsgálatainknak a minták együttes értékelésének lehetősége és fent bemutatott eredménye fontos gyakorlati értéket ad. 22 klinikai jellegzetesség, biomarker és genetikai adat, adott algoritmus szerinti értékelésével olyan mintákat nyerhetünk, melyek együttes értéke messze meghaladja a csupán a klasszikus rizikófaktorok felmérésén és analizálásán nyugvó (ma általánosan javasolt, [Prevention of coronary..., 1994, 1998]) rizikóbecslést. Ugyanakkor vizsgálatunk alapján jelenleg csak az állapítható meg, hogy a LAD analízis módszere alkalmas a változók közötti kölcsönhatások felismerésére valós adatokat tartalmazó, orvosi adatbázisokon. A módszerrel patofiziológiailag releváns klinikai alcsoportokat tudtunk azonosítani betegeink között. Az a tény, hogy analízisünkben genetikai tényezők és biomarkerek alapján történt a minták kialakítása arra utal, hogy a LAD alkamas gén-gén, gén-környezet kölcsönhatások felderítésére. A gyakorlatban ez azt jelentheti, hogy azonosíthatóvá válhat egy heterogén betegcsoporton belül több olyan alcsoport, melyben a genetikai alapok miatt eltérő az adott betegség lefolyása.

A jelen eredmények alapján nem vonhatók le azonban gyakorlati következtetések és ajánlások a rizikóbecslés konkrét menetére, tekintettel a hiányzó adatokra és a le nem fedhető (vagy csak tévesen lefedhető) személyek nagy számára. Nagyon ígéretes kutatási iránynak látszik azonban a LAD módszer további vizsgálata, és klinikai tesztelése újabb, homogén és hiánytalan (populációs?) adatbázisokon.

5, Az új megállapítások összefoglalása, következtetések

Az eredmények rövid összefoglalása

1. Az anti-Hsp60 autoantitestek szintje emelkedett súlyos koronária betegségben szenvedőkben a beteg kontrollokhoz és az egészséges kontrollokhoz viszonyítva is. Az anti-Hsp60 autoantitestek a klasszikus rizikófaktoroktól független jelzői a koronária betegségnek.
2. Az anti-Hsp65 antitestek emelkedettek súlyos koronária betegségben, szintjük szorosan összefügg az anti-Hsp60 autoantitestek szintjével.
3. Lényeges strukturális és funkcionális különbségek mutathatók ki az anti-Hsp60 autoantitestek és az anti-Hsp65 antitestek között.
4. A humán Hsp60 és *M. bovis* Hsp65 összehasonlító B-sejt epitóp térképezése során 12 epitóp régiót lehetett jellemezni egészségesek mintáival. Az epitópok többsége mindkét molekulán megtalálható volt, azonban voltak olyan epitópok, melyek csak a humán Hsp60-on, míg mások csak a Hsp65-ön voltak jellemezhetőek.
5. Egészségesekben domináltak az olyan epitóp-specifitású antitestek, melyek a tetradecamer molekula külső felszínét ismerik fel.
6. Koronária betegekben a fokozott anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitestválasz az epitópok szintjén is kimutatható. A Hsp65 molekula B-sejt epitópjai vonatkozásában epitóp spreading jelenséget észleltünk.
7. Koronária betegekben az epitóp spreading kiterjedt olyan antitestek megjelenésére, melyet a tetradecamer molekula belső felszíne ellen irányulnak.
8. A 60 kDa-os hőszokkfehérje aktiválja a humán komplementrendszert a klasszikus reakcióúton. Az aktiváció beindítóit specifikus immunkomplexek. Lényegesen erősebb komplementaktiváció jellemzi az anti-Hsp60 autoantitesteket, mint az anti-Hsp65 antitesteket.
9. A komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek mérésére szolgáló eljárást szabadalmi védetség alá lehetett helyezni.
10. A komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitestek klinikai értékét a korai szívinfarktus családi rizikója vonatkozásában lehetett kimutatni. Azok az egészséges gyermekek, akiknek valamelyik felmenője korai szívinfarktust szenvedett el, fokozott mennyiségben termelnek CA anti-Hsp60 autoantitesteket, melyek szintje független a hagyományos rizikófaktoroktól.

11. SLE-ben szenvedő betegek mintáiban nem fokozott az anti-Hsp60 autoantitestek szintje. Ez arra utal, hogy a poliklonális B-sejt aktivációt és a szérum IgG koncentrációjának növekedését nem kíséri az anti-Hsp60 IgG mennyiségének fokozódása.
12. Az SLE-hez hasonlóan, HIV-betegségben sem emelkedett az anti-Hsp60 IgG mennyisége. Az autoantitestek szintje a betegség progressziójával csökken.
13. Az anti-Hsp60 IgG és anti-C1q autoantitestek között keresztreakciót észleltünk, amit B-sejt epitóp szinten is ki lehetett mutatni.
14. Gyulladásos bélbetegségben szenvedőkben csökkent anti-bakteriális Hsp65 IgG szinteket észleltünk. Ezekben a betegekben az anti-Hsp60 autoantitestek mennyisége nem különbözött a kontroll csoporttól.
15. Újszülött egér lépsejtjeiből készített IgM hibridóma könyvtárban polireaktív, Hsp60-at is felismerő antitesteket találtunk.
16. Egészséges újszülöttek köldökzsinór vérében ki tudtunk mutatni IgM alosztályba tartozó anti-Hsp60 autoantitesteket. Az antitestek mennyisége független volt az anyai antitestek és az anti-Hsp65 antitestek mennyiségétől.
17. Az anti-Hsp60 autoantitestek szintje egészséges, középkorú férfiakban nem változik 5 év követés alatt.
18. Szisztémás autoimmun betegségben szenvedőkben kapcsolatot lehetett kimutatni az anti-Hsp65 IgG-szintek és a *Helicobacter pylori* fertőzöttség között. Ugyanezt a kapcsolatot koronária betegek mintáiban is észleltük.
19. A *Chlamydia* infekció szerológiai jelei és az anti-Hsp60 vagy anti-Hsp65 antitestek között nem találtunk összefüggést.
20. A *Chlamydia* infekció és az anti-Hsp60 autoantitestek koronária rizikót növelő hatása összeadódó.
21. Nem találtunk kapcsolatot az anti-Hsp60 autoantitestek és a CMV infekció szerológiai jelei között koronária betegekben.
22. Az interleukin-6 gén promóterének -174-es G>C polimorfizmusa szignifikáns kapcsolatot mutatott az anti-Hsp60 és anti-Hsp65 antitestszintekkel. A magas csúcs IL-6 termeléssel jellemezhető GG genotípust hordozókban észleltük a legmagasabb autoantitestszinteket finn populációban.
23. Az IL-6 -174 polimorfizmus és anti-Hsp60 antitestszintek kapcsolatát egy független vizsgálatban, magyar populációt tanulmányozva is meg tudtuk erősíteni.

24. Az immunglobulin GM f, z allotípusok és anti-Hsp60 autoantitestek szintje között kapcsolatot észleltünk.
25. Az IL-6 -174 polimorfizmus és az immunglobulin GM allotípus determinánsok episztatikus kölcsönhatásban álltak az autoantitestszintekkel.
26. Az anti-Hsp60 autoantitestek prospektív értékkel bírnak koronária betegekben az összhalálozás és az új kardiovaszkuláris események előrejelzésében.
27. Sikeresen került alkalmazásra a logikai adatfeldolgozás módszer olyan minták azonosítására, melyek koronária betegek alcsoportjait különítik el. Az eseménymentes túlélők vonatkozásában robusztus mintákat sikerült jellemezni, míg a halálozás+esemény csoportot csak fragmentált mintákkal lehetett leírni.
28. A LAD modellek összesített értéke kiemelkedő az események előrejelzése vonatkozásában.
29. A LAD módszer egyértelműen alkalmasnak bizonyult változók közötti interakciók felderítésére, ami a komplex betegségek patomechanizmusának jobb megértését segítheti a jövőben.

Következtetések

A szervezet homeosztázisának szabályozása nagyrészt makromolekulák közötti kölcsönhatásokon nyugszik. A kölcsönhatások alapvető jellegzetessége a plaszticitás, melyet az időben és térben mutatott változékonysággal jellemezhetünk. A kölcsönhatásokat külső, környezeti tényezők is befolyásolhatják. Figyelembe véve direkt (pl. génexpresszió szabályozás, receptor-ligand kapcsolat, stb.) és indirekt (epigenetikai szabályozás, bizonyos külső körülmények között érvényesülő szabályozás) kapcsolatokat is, a genetikai sokféleség együttes hatása határozza meg egy adott személy aktuális állapotát. A szervezeti integritás és homeosztázis sérülésének egyik legjobb jelzője az immunrendszer állapota. Az atherosclerosis példáján bemutatva az immunrendszer képes integráltan jelezni a károsodás fennállását és mértékét az adott szervezetben. Az immunrendszer működésének sokfélesége azonban eltéréseket okozhat populációk és személyek között, ami kiterjedhet olyan változásokra, melyek csak bizonyos körülmények között (pl. dohányzás vagy elhízás esetén, vagy valamely infekció felléptekor) mutatkoznak meg. Ilyen esetekben sok, egyenként talán nem is jelentős (normál variánsnak tekinthető) tényező hatása összeadódhat, és ez új fenotípus megjelenését eredményezi. Az „elenyésző” biológiai hatású, de egymás hatását erősítő

változatok összességének érzékeltetésére vezettük be az *immundefektussal való terheltség* fogalmát.

A hősokkfehérjék, mint az immunválasz dajkái és lehetséges célpontjai összetett szereppel bírnak különböző betegségek immun-patomechanizmusában. Jelen dolgozatban bemutatásra került, hogy a Hsp60 mint kiemelten védett saját antigén természetes autoantitestek célpontja lehet, ellene reguláló, védő immunválasz van jelen. Ez az immunválasz sérülhet az élet folyamán, ennek okai különféle infekciók lehetnek. Az infekciók kedvezőtlen hatása genetikai alapon kifejezettebb lehet bizonyos csoportokban. Az anti-Hsp60 autoantitestek magas szintjét két genetikai tényezővel, egy citokin polimorfizmussal és egy immunglobulin allotípus determinánssal kapcsolatban is észleltük. A két tényező között episztatikus kölcsönhatást tapasztaltunk, ami további kutatásainkat a változók közötti kölcsönhatások vizsgálatára irányították. Ezek a vizsgálatok megerősítették azt a nézetünket, hogy a komplex betegségek vizsgálatához komplex válaszokat lehetővé tevő feldolgozási metodikákat kell alkalmaznunk. A logikai adatfeldolgozás módszerével sikerült érbetegekben olyan modelleket (a betegek alcsoportjait) azonosítanunk, melyeket hagyományos statisztikai módszerekkel nem tudtunk volna felderíteni. Ezek a modellek orvosi szempontból relevánsnak bizonyultak, és megerősítették az anti-Hsp60 autoantitestek atherosclerosisban játszott fontos szerepét. Eredményeink megerősítik a Hsp60 elleni autoimmun válasz fontosságát atherosclerosisban. Az atheroscleroticus érbetegségben szenvedők jelentős részében patogenetikai szereppel bírnak ezek az autoantitestek. Megfigyeléseink alátámasztják az atherosclerosis autoimmun eredetéről felállított hipotézist. Az autoimmun reakciónak véleményünk szerint két forrása is lehet atherosclerosisban: az élet során átélt infekciók összeadódó hatására keletkezhetnek a saját Hsp60-nal keresztreakáló antitestek, melyek az erek falát károsító stresszhatások nyomán fokozottan expresszálandó hősokkfehérjékkel reagálva gyulladást és károsodást indukálhatnak. Az anti-Hsp60 autoantitestek forrását képezhetik azonban az immunrendszer érése során megőrződött, a perifériás toleranciában fontos szerepet játszó, reguláló, természetes autoantitestek is. Ezen antitestek mennyiségében és működésében bekövetkező változások szintén hozzájárulhatnak az erek falában fellépő gyulladás kiváltásához és elmélyüléséhez.

A jövőben az új eredmények tükrében indokolt lesz aktív vagy passzív immunterápiát alkalmazni érbetegekben a saját Hsp60-at károsító immunreakció áthangolására, lecsendesítésére és kioltására.

Irodalmi hivatkozások:

- Aarli JA. **2003**. Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem* 10(19): 1931-7
- Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. **2003**. T cells and autoantibodies to human Hsp70 in type 1 diabetes in children. *J Autoimmun* 20: 313-321
- Adam B, Calikoglu E. **2004**. Serum interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein levels in subjects with active Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18(3): 318-20
- Alexe G, Alexe S, Liotta LA, Petricoin E, Reiss M, Hammer PL. **2004**. Ovarian cancer detection by logical analysis of proteomic data. *Proteomics* 4: 766-783
- Alexe S, Blackstone E, Hammer PL, Ishwaran H, Lauer MS, Pothier Snader CE. **2003**. Coronary risk prediction by logical analysis of data. *Ann Oper Res* 119: 15-42
- Amberger A, Maczek C, Jürgens G et al. **1997**. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress&Chap* 2: 94-103
- Avrameas S. **1991**. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to gnothi seauton. *Immunol Today* 12: 154-159
- Baccala R, Vo Quang T, Gilbert M, Ternynck T, Avrameas S. **1989**. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4624-4629
- Bardak Y, Aridogan BC. **2004**. The demonstration of serum interleukin 6-8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behcet's disease with ocular involvement. *Ocul Immunol Inflamm* 12(1): 53-8
- Bason C, Corrocher R, Lunardi C et al. **2003**. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in patogenesis of atherosclerosis. *Lancet* 362: 1971-1977
- Bateson W. **1909**. Mendel's principles of heredity. Cambridge, Cambridge University Press
- Benneromo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveria A, Green F, Tornvall P. **2004**. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: Implications for a variety of major diseases? *Clin Chem* 50: 2136-2140
- Besredka M. **1901**. Les antihémolysines naturelles. *Ann Inst Pasteur* 15: 758-768
- Birnie DH, Holme ER, McKay IC et al. **1998**. Association between antibodies to heat shock protein 65 and coronary atherosclerosis. Possible mechanism of action of *Helicobacter pylori* and other bacterial infections in increasing cardiovascular risk. *Eur Heart J* 19: 387-394

- Bozner P, Wilson GL, Druzhyna NM, Bryant-Thomas TK, LeDoux SP, Wilson GL, Pappolla MA. **2002**. Deficiency of chaperonin 60 in Down's syndrome. *J Alzheimers Dis* 4(6): 479-86.
- Briones P, Vilaseca MA, Ribes A, Vernet A, Lluch M, Cusi V, Huckriede A, Agsteribbe E. **1997**. A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decreased amount of heat shock protein 60. *J Inherit Metab Dis* 20(4): 569-77
- Cancino-Diaz JC, Ruiz-Gonzalez V, Ramirez-Resendiz L et al. **2004b**. IgG class antibodies from psoriasis patients recognize the 60 kDa heat shock protein of *Streptococcus pyogenes*. *Int J Dermatol* 43: 341-347
- Cancino-Diaz JC, Vargas-Rodriguez L, Grinberg-Zylberbaum N et al. **2004a**. High levels of IgG class antibodies to recombinant HSP60 kDa of *Yersinia enterocolica* in sera of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 88: 247-250
- Casali P, Notkins AL. **1989**. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 10: 364-372
- Cervanak J, Kiss K, Uher F. **1999**. Partial characterization of two lymphocyte-specific natural autoantibodies isolated from newborn mice. *Acta Microbiol Immunol Hung* 46: 53-62
- Chen S, Roseman AM, Hunter A et al. **1994**. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* 371: 261-264
- Cohen IR, Young DB. **1991b**. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immuno. Today* 12: 105-110
- Cohen IR. **1991a**. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu Rev Immunol* 9: 567-589
- Crama Y, Hammer PL, Ibaraki T. **1988**. Cause-effect relationships and partially defined Boolean functions. *Ann Oper Res* 16: 299-326
- Cross JT, Benton HP. **1999**. The roles of interleukin-6 and interleukin-10 in B cell hyperactivity in systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res* 48(5): 255-61
- Csermely P. **2004**. Strong links are important, but weak links stabilize them. *Trends Biochem Sci* 29(7): 331-4
- Csizmadia Zs, Vízvári B. **2004**. Methods for the analysis of large real-valued medical databases by logical analysis of data. *Rutcor Research Reports* 42-2004
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM et al. **2004**. C-reactive protein and other circulatory markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350: 1387-1397

- Danieli MG, Candela M, Ricciati AM et al. **1992**. Antibodies to mycobacterial 65 kD heat shock protein in systemic sclerosis (scleroderma). *J Autoimm* 5: 443-452
- Dawber TR, Kannel WB. **1970**. Coronary heart disease in seven countries. I. The study program and objectives. *Circulation* 41(4 Suppl): I 1-8
- De Milito A. **2004**. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2(1): 11-21
- Dieude M, Senecal JL, Raymond Y. **2004**. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 50: 3221-3231
- Durai M, Kim HR, Moudgil KD. **2004**. The regulatory C-terminal determinants within mycobacterial heat shock protein 65 are cryptic and cross-reactive with the dominant self homologs: implications for the pathogenesis of autoimmune arthritis. *J Immunol* 173: 181-188
- Durandy A, Schiff C, Bonnefoy JY et al. **1993**. Induction by anti-CD40 ligand and cytokines of IgG, IgA and IgE production by cells from patients with X-linked IgM syndrome. *Eur J Immunol* 23: 2294-2301
- Elias D, Cohen IR. **1994**. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343: 704-706
- Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Yaron M, Caspi D. **2000**. Serum levels of IL-10, IL-6, IL-1ra, and sIL-2R in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 19(3): 101-5
- Fischer HP, Sharrock CE, Panayi GS. **1992**. High frequency of cord blood lymphocytes against mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. *Eur J Immunol* 22: 1667-1675
- Fisher RA. **1918**. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans R Soc Edinburgh* 52: 399-433
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. **1998**. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376
- Füst G, Harcos P, Duba J és mtsai **1999**. Hasonlóságok és különbségek a cardiovascularis és a cerebrovascularis megbetegedések genetikai háttérében és immunológiai mechanizmusában. *Magyar Belorvosi Archivum* 52: 387-393
- Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R. **2003**. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 108 (1 Suppl): II 195-9
- Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D, Fiszer U, Czlonkowska A. **2001**. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 12(3): 235-9

- Grubb R. **1995**. Advances in human immunoglobulin allotypes. *Exp Clin Immunogenet* 12: 191-197
- Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, Gui M, Allman D, Stewart CL, Silver J, Hardy RR. **1999**. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285(5424): 113-6
- Heltai K, Kis Z, Burian K et al. **2004**. Elevated antibody levels against *Chlamydia pneumoniae*, human Hsp60 and mycobacterial Hsp65 are independent risk factors in myocardial infarction and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 173: 339-346
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T. **1986**. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76
- Hirano T. **1998**. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16: 249-284
- Hochleitner BW, Hochleitner EO, Obrist P et al. **2000**. Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 617-623
- Hoh J, and Ott J. **2003**. Mathematical multi-locus approaches to localizing complex human trait genes. *Nat Rev Genetics* 4: 701-709
- Hoppichler F, Lechleitner M, Traweger C et al. **1996**. Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 126: 333-338
- Horwich AL, Weber-Ban E, Finley D. **1999**. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11033-11040
- Horwich TB, Hamilton MA, Maclellan WR, Fonarow GC. **2002**. Low serum total cholesterol is associated with marked increase in mortality in advanced heart failure. *J Card Fail* 8: 216-224
- Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L et al. **2002**. Autoimmunity to human heat shock protein 60, *Chlamydia pneumoniae* infection, and inflammation in predicting coronary risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 431-437
- Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L et al. **2003**. Synergistic effect of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection, autoimmunity, and inflammation on coronary risk. *Circulation* 107: 2566-2570
- Hussell T, Isaacson PG, Spencer J. **1993**. Proliferation and differentiation of tumour cells from B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in vitro. *J Patol* 169(2): 221-7

- Ichiyoshi Y, Casali P. **1995**. Analysis of the structural correlates for self-antigen binding by natural and disease-related autoantibodies. In vitro expression of recombinant and/or mutagenized human IgG. *Ann N Y Acad Sci* 764: 328-41
- Ishii E, Yokota K, Sugiyama T. **2001**. Immunoglobulin G1 antibody response to *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 is closely associated with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1056-1059
- Jerne NK. **1974**. Towards a network theory of immune system. *Ann Inst Pasteur Immunol* 125C: 373-395
- Jones DB, Coulson AFW, Duff GW. **1993**. Sequence homologies between Hsp60 and autoantigens. *Immunol Today* 14: 115-8
- Kameda H, Pandey JP, Kaburaki J, Inoko H, Kuwana M. **1998**. Immunoglobulin allotype gene polymorphisms in systemic sclerosis: interactive effect of MHC class II and KM genes on anticentromere antibody production. *Ann Rheum Dis* 57: 366-370
- Kaufmann SH. **1990**. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11: 129-136
- Kiang JC and Tsokos GC. **1998**. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80: 183-201
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M et al. **2002**. Toll-like receptor 4 polymorphism and atherogenesis. *N Engl J Med* 347: 185-192
- Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L. **2003**. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet* 12(10):1101-10
- Kumar-Chauhan S, Kumar-Tripathy N, Sinha N, Singh M, Nityanand S. **2004**. Cellular and humoral immune response to mycobacterial heat shock protein-65 and its human homologue in Takayasu's arteritis. *Clin Exp Immunol* 138: 547-553
- Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. **2000**. Analysis of soluble and cell surface factors regulating anti-DNA topoisomerase-I autoantibody production demonstrates synergy between Th1 and Th2 autoreactive T-cells. *J Immunol* 164: 6138-6146
- Lachumanan R, Devi S, Cheong YM, Rodda S, Pang T. **1993**. Epitope mapping of the Sta58 major outer membrane protein of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 61: 4527-4531
- Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L et al. **1998**. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Meth* 216: 117-137
- Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Coutinho A, Kazatchkine MD. **1995**. Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self

- antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *Eur J Immunol* 25: 2598-2604
- Lauer MS, Alexe S, Pothier Snader CE, Blackstone E, Ishwaran H, Hammer PL. **2002**. Use of the logical analysis of data method for assessing long-term mortality risk after exercise electrocardiography. *Circulation* 106: 685-690
- Lerman A, Zeiher AM. **2005**. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111(3): 363-8
- Lydyard PM and van Eden W. **1990**. Heat shock proteins: immunity and immunopatology. *Immunol Today* 11: 228-229
- Maeda H, Miyamoto M, Koikeguchi S et al. **2000**. Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28: 219-224
- Mahdi OS, Horne BD, Mullen K, Muhlestein JB, Byrne G. **2002**. Serum immunoglobulin G antibodies to chlamydial heat shock protein 60 but not to human and bacterial homologs are associated with coronary artery disease. *Circulation* 106: 1659-1663
- Mandal K, Jahangiri M, Mukhin M, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q. **2004**. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 110: 2588-2590
- Mayr M, Kiechl S, Mendall MA, Willeit J, Wick G, Xu Q. **2003**. Increased risk of atherosclerosis is confined to CagA-positive *Helicobacter pylori* strains. Prospective results from the Bruneck study. *Stroke* 34: 610-615
- Mayr M, Kiechl S, Willeit J et al. **2000**. Infections, autoimmunity and atherosclerosis. Associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus with the immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation* 102: 833-839
- Metzler B, Schett G, Kleindienst R et al. **1997**. Epitope specificity of anti-heat shock protein 65/60 serum antibodies in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 536-541
- Miller GJ, Bauer KA, Barzegar S, Cooper JA, Rosenberg RD. **1996**. Increased activation of the haemostatic system in men at high risk for fatal coronary heart disease. *Thromb Haemost* 75: 767-771
- Moore JH. **2003**. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered* 56: 73-82
- Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S et al. **1995b**. Invariance of the normal human IgG antibody repertoire. *J Immunol* 154: 5769-5778

- Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. **1996.** The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand J Immunol* 44: 243-251
- Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri S, Barreau C, Coutinho A, and Kazatchkine MD. **1995a.** Invariance and restriction towards a limited set of self antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3839-3843
- Mukherjee M, De Benedictis C, Jewitt D, Kakkar VV. **1996.** Association of antibodies to heat-shock protein-65 with percutaneous transluminal coronary angioplasty and subsequent restenosis. *Thromb Haemostat* 75: 258-260
- Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW, Young RA, Kaufmann SH. **1989.** T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol* 143(9): 2844-2849
- Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP et al. **1997.** Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100(11): 2680-90
- Nobrega A, Haury M, Grandien A, Malanchere E, Sundblad A and Coutinho A. **1993.** Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological 'homunculus' of antibodies in normal serum. *Eur J Immunol* 23: 2851-2859
- Noris M, Daina E, Gamba S, Bonazzola S, Remuzzi G. **1999.** Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions? *Circulation* 100(1): 55-60
- Okada H, Murakami S. **1998.** Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9(3): 248-66
- Pados Gy. **2004.** Az új Európai irányelvektől a hazai terápiás konszenzusig. *Metabolizmus* 2(1): 45-50
- Pandey JP. **2001.** Immunoglobulin GM and KM allotypes and vaccine immunity. *Vaccine* 19: 613-617
- Papassotiropoulos A, Hock C, Nitsch R. **2001.** Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 863-871
- Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S et al. **2002.** Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *Int Immunol* 14: 453-461

- Paul AGA, van Kooten PJS, van Eden W, van der Zee R. **2000**. Highly autoproliferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN- γ and are protective in adjuvant arthritis. *J Immunol* 165: 7270-7277
- Pepys MB and Hirschfield GM. **2003**. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805-1812
- Perschinka H, Mayr M, Millonig G et al. **2003**. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1060-1065
- Pockley AG, Blumer J, Hanks BM, Wright BH. **1999**. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chap.* 4: 29-35
- Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. **2002**. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 106(2): 184-90
- Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. *Eur Heart J* **1994**, 15: 1300-1330
- Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Task Force of European and other Societies on coronary prevention. *Eur Heart J* **1998**, 19: 1434-1503
- Prohászka Z, Singh M, Nagy K, Kiss E, Lakos G, Duba J, Füst G. **2002**. Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones* 7(1): 17-22
- Quintana FJ, Getz G, Hed G, Domany E, Cohen IR. **2003**. Cluster analysis of human autoantibody reactivities in health and in type 1 diabetes mellitus: a bio-informatic approach to immune complexity. *J Autoimm* 21: 1-11
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. **2001**. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358: 1749-1753
- Ritoók Zs. **1896**. Adatok az arterio-sclerosis aetiológiai viszonyaihoz. *Orvosi Hetilap*, 45: 547-549; 46: 561-562; 47: 575-577; 48: 589-590; 49: 600-601 (folytatásokban)
- Ross R, Glomset JA. **1973**. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180(93): 1332-9

- Rothenbacher D, Hoffmeister A, Bode G, Miller M, Koenig W, Brenner H. **2001**. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 and risk of coronary heart disease: a case control study with focus on markers of systemic inflammation and lipids. *Atherosclerosis* 156: 193-199
- Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C et al. **2001**. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 104(1): 25-31
- Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. **2004**. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 41(12): 1123-33
- Scala E, Pallotta S, Frezzolini A. **2004**. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 138(3): 540-6
- Schett G, Metzler B, Kleindienst R et al. **1999**. Myocardial release of heat shock protein (hsp) 60 and a suppression of the anti-hsp65 immune response. *Cardiovasc Res* 42: 685-695
- Schett G, Metzler B, Mayr M. et al. **1997**. Macrophage lysis mediated by autoantibodies to heat shock protein 60/65. *Atherosclerosis* 128: 27-33
- Schett G, Xu Q, Amberger A et al. **1995**. Autoantibodies against heat shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest* 96: 2569-2577
- Schwartz M, Silver H. **2000**. Lymphocytes, autoantibodies and psychosis-coincidence versus etiological factor: an update. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 37(1): 32-6
- Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. **1986**. Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Patol* 123(1): 109-25
- Smieja M, Gnarpe J, Lonn E et al. **2003**. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 107: 251-257
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. **2002**. Molecular biology of thermoregulation. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* 92: 1725-1742
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al. **1994**. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 89(5): 2462-78

- Staub HL, Norman GL, Crowther T et al. **2003**. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock protein as risk factors for acute cerebral ischaemia. *Arch Neuropsychiatr* 61: 757-763
- Stordeur P and Goldman M. **1998**. Interleukin 10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects. *Int Rev Immunol* 16: 501-522
- Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Yoshie H, Hara K. **2000**. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 120(2): 285-93
- Takenaka R, Yokota K, Mizuno M et al. **2004**. Serum antibodies to *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 correlate with the response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to eradication of *H. pylori*. *Helicobacter* 9: 194-200
- Tanaka T, Yamakawa N, Koike N. **1999**. Behcet's disease and antibody titers to various heat-shock protein 60s. *Ocul Immunol Inflamm* 7(2): 69-74
- The Framingham study. **1966**. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 34(4): 553-5
- Thornton-Wells TA, Moore JH, Haines JL. **2004**. Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity. *Trends Genet* 20: 640-647
- Ulmansky R, Cohen CJ, Szafer F et al. **2002**. Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J Immunol* 168: 6463-6469
- van Eden W, Thole JE, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, Cohen IR. **1988**. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331(6152): 171-173
- van Eden W, van der Zee R, Prakken B. **2005**. Heat shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318-329
- Vasconcellos R, Nobrega A, Haury M, Viale AC, Coutinho A. **1998**. Genetic control of natural antibody repertoires: I. IgH, MHC and TCR beta loci. *Eur J Immunol* 28(3): 1104-1115
- Walton KW. **1975**. Pathogenetic mechanisms in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 35: 542-558
- Wang XF, Wang D, Zhu W, Delrahim KK, Dolnak D, Rapaport MH. **2003**. Studies characterizing 60 kDa autoantibodies in subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53: 361-375

- Weitgasser R, Lechleitner M, Koch T et al. **2003**. Antibodies to heat shock protein 65 and neopterin levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111: 127-131
- Wick G, Knoflach M, Xu Q. **2004**. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 22: 361-403
- Wick G, Knoflach M, Xu Q. **2004**. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 22: 361-403
- Wick G, Perschinka H, Millonig G. **2001**. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 22: 665-669
- Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. **1995**. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 16: 27-33
- Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ et al. **1992**. Induction of atherosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Tromb* 12: 789-799
- Xu Q, Kiechl S, Mayr M et al. **1999**. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. Clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation* 100: 1169-1174
- Xu Q, Luef G, Weimann S, Gupta RS, Wolf H, Wick G. **1993a**. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat shock protein reactive antisera. *Arterioscler Tromb* 13: 1763-1769
- Xu Q, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G. **1990**. Immunology of atherosclerosis: Cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen presentation in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopatol* 56: 344-359
- Xu Q, Oberhuber G, Wick G. **1989**. Immunology of atherosclerosis: Cell composition and MHC class II antigen expression of aortic intima (abstract). *Arteriosclerosis* 9: 703a
- Xu Q, Willeit J, Marosi M et al. **1993b**. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 341: 255-259
- Yamaguchi H, Osaki T, Kai M, Taguchi H, Kamiya S. **2000**. Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 68: 3448-3454
- Yang M, Zheng J, Yang Q et al. **2004**. Frequency-specific association of antibodies against heat shock proteins 60 and 70 with noise-induced hearing loss in Chinese workers. *Cell Stress Chaperones* 9: 207-213

- Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. **1987**. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 6: 2939-2945
- Yi Y, Zhong G, Brunham RC. **1993**. Continuous B-cell epitopes in *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60. *Infect Immun* 61: 1117-1120
- Yonekura K, Yukota S, Tanaka S, Kubota H, Fujii N, Matsumoto H, Chiba S. **2004**. Prevalence of anti-heat shock protein antibodies in cerebrospinal fluids of patients with Guillan-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 156: 204-209
- Yunoki N, Yokota K, Mizuno M et al. **2000**. Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 574-577
- Zhu J, Katz RJ, Quyyumi AA et al. **2004**. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels. *Circulation* 109: 36-41
- Zhu J, Quyyumi AA, Rott D et al. **2001**. Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation* 103: 1071-1075

Az alkalmazott statisztikai módszerek leírása

A folytonos, nem normál eloszlást mutató változók megjelenítése a szövegben és a táblázatokban medián (25%-75% percentilis) értékekkel történt, az ettől való eltérés külön jelezve van. Az egyes független csoportok átlagainak összehasonlítása a nemparaméteres t-próbával (Mann-Whitney próba) vagy nemparaméteres, egy szempontos varianciaanalízissel (Kruskal-Wallis próba) történt. Több csoport követéses, páros, nemparaméteres összehasonlításra a Friedman-féle próbát használtuk. A kategóriás változók az esetszám (százalék) feltüntetésével vannak megjelenítve. A csoportok közötti összehasonlítások a Fisher-féle egzakt vagy a khi-négyzet próbával történtek. Kétszempontos varianciaanalízist használtunk abban az esetben, ha több csoport több alcsoportját kellett összehasonlítani. A varianciaanalízisek során (a többszörös összehasonlítás torzító hatásának kiküszöbölésére) Bonferroni- vagy Dunn-féle poszt-tesztet használtunk az egyes csoport-párok közötti különbségek becslésére. Folyamatos, nem normál eloszlású változók között a korrelációt a Spearman-féle rangszám-összeg számításos módszerrel határoztuk meg, a korrelációs együtthatót (r) és a p -értékét tüntettük fel.

Többszörös logisztikus regressziót abban az esetben használtunk, amikor az összehasonlított csoportok között több változó vonatkozásában is szignifikáns különbséget tapasztaltunk. A folytonos változókat kategóriákra bontottuk. A kategóriák kialakítása vagy valamely jól jellemezhető vágópont (csoport mediánja, alsó vagy felső tercilise, kvartilise), vagy ROC analízis segítségével történt. A kategóriák közötti rizikó-különbségeket esély-hányados (95% megbízhatósági intervallum) formájában fejeztük ki. Több változó túlélésre kifejtett hatását a Cox-féle arányos kockázat modellek segítségével becsültük. A túlélési görbéket a Kaplan-Meier módszer szerint szerkesztettük. Az egyes csoportok túlélése közötti különbségek becslését a lograng próbával végeztük. Klaszteranalízist hasonló tulajdonságú személyek vagy változók azonosítására használtunk, melynek során teljes kapcsoltságot alakítottunk ki, és ezt fa diagrammon ábráztuk.

Minden feltüntetett p -érték kétoldalas, a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

A statisztikai analízist a GraphPad Prism 3.0 és a StatMate 1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com), az SPSS 11.5.1 (SPSS Inc., www.spss.com) és a Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA, www.statsoft.com) programcsomagokkal végeztük. A statisztikai próbák és fogalmak magyar nevének helyesírásakor a Klinikai Biostatistikai Társaság ajánlását (www.biostat.hu) vettük figyelembe.

Rövidítések jegyzéke

AA	aminosav
AU	önkéntes egység
CA anti-Hsp60	komplementaktiváló anti-Hsp60 autoantitest
cHsp60	<i>Chlamydia</i> Hsp60
CMV	cytomegalovírus
CRP	C-reaktív fehérje
FITC	fluoreszcein izotiocianát
Grp	glükóz regulált fehérje
HDL	high density lipoprotein
Hsp	hő sokkfehérje
Hsp60	humán Hsp60
Hsp65	<i>M. bovis</i> Hsp65
IVIG	intravénás immunglobulin
LAD	logikai adatfeldolgozás
LD	linkage distance
LDL	low density lipoprotein
NYHA	New York Heart Association
OD	optikai denzitás
SD	szórás
SEM	az átlag standard hibája
SLE	systemas lupus erythematodes
TNP	2,4,6 trinitrophenyl
ISZB	ischaemiás szívbetegség
AMI	akut myocardiális infarktus
PTCA	perkután transluminális koronária angioplasztika
CABG	koronária-aorta by-pass graft
SAP	stabil angina pectoris
EBCT	electron-beam computed tomography imaging
IMT	intima-media thickness

Kérdések:

- Elég-e a saját eredmények megvilágítása mások cikkeivel/eredményeivel? Kell-e még diszkutálni mások eredményeit?
- A célkitűzéseket kell-e jobban kiemelni (szövegen belül, vagy külön sorba/bekezdésbe?)
- Eritóp és totál IgG negatív korrelációkat nem tudom diszkutálni, (ld. p39), kérek szépen ötleteket!
- Kell-e egy egyszerűsített ábra a végén a LAD modellek struktúrájának mutatóására (hogyan képi módon is jelenjen meg, a szövegben és jelöléssel összefűzött modellek).
- Saját Quintana&Cohen cikk nem szerepel a mellékletben, mint saját. Kell-e ennél jobban diszkutálni?
- Jó-e, követhető-e így a struktúra? Nem aránytalan (eleje bővebb, mondjuk ott sok is az adat)?
- Nem zavaró/baj, hogy a melléklet cikkei nem egyforma súllyal vannak bemutatva, diszkutálva?
- Szerinted segítene, ha az egész oldalas ábrákat (5, 7, és 16) a melléklet végére megegyezően külön betenném, hogy lehessen egyszerre olvasni a szöveget és nézni az ábrát?
- Van sajnos néhány ismételt mondat-bekezdés, zavaró?
- A 3. és 4. fejezetben már sajnos fellazult a zárt fegyelem, és laza a bevezető (4-esben már nincs is...) és nem annyira következetes a diszkusszió (van ahol van benne eredmény is). Ez elmegy (vegyem ki a legelejéről a bevezetőből, hogy minden fejezet struktúrája szép, és akkor nem annyira zavaró)? Vagy bővítem/tisztítom még a 3-4-et?

